

**Genomweite molekular-zytogenetische Charakterisierung
INK4A/ARF-defizienter Mauslymphome
und
Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von
Common Fragile Sites**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von
Anne Helmrich
aus Jena

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Rödel
Prof. Dr. Evelin Schröck
Prof. Dr. Karl Sperling

Eingereicht am: 01. Februar 2005

Inhalt

1	Einleitung	5
1.1	Der Zellzyklus und seine Checkpoint-Regulation	6
1.2	INK4a und ARF	6
1.2.1	Ein Genlokus – zwei Tumorsuppressorproteine	6
1.2.2	Generierung und Klassifizierung der in dieser Arbeit analysierten Lymphome	10
1.3	Common Fragile Sites (CFSs)	12
1.3.1	Grundlagen zu Fragile Sites	12
1.3.2	CFSs in Säugetieren	17
1.3.3	Merkmale von CFSs	19
1.4	Methodische Grundlagen der eingesetzten molekular-zytogenetischen Analysen	23
1.4.1	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	23
1.4.2	Spektrale Karyotypisierung (SKY)	25
1.4.3	Chromosomale CGH (Comparative Genomic Hybridization)	27
2	Zielstellung	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Chromosomenpräparation	30
3.2	Herstellung der Sonden	30
3.2.1	Gewinnung genomischer DNA	31
3.2.2	Gewinnung der BAC-DNA	31
3.2.3	DOP-PCR-Reaktionen für Spektrale Karyotypisierung (SKY)	33
3.3	Markierung	34
3.3.1	Markierung mittels DOP-PCR für Maus-SKY-Analysen	36
3.3.2	Markierung mittels Nick-Translation für Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) oder Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung (FISH)	37
3.4	Hybridisierung	38
3.4.1	Präparation der Objektträger	38
3.4.2	Hybridisierung der Sonden	39
3.5	Detektion	39
3.6	Auswertung der SKY-Experimente	41
3.7	Auswertung der CGH- und FISH-Experimente	41
3.8	Kartierung der CFSs	42
3.9	Statistische Berechnung	42
3.10	Verwendung öffentlich zugänglicher Datenbanken	43
3.11	Computeranalyse der DNA-Helix-Flexibilitäten	44
4	Ergebnisse	46

4.1	Molekular-zytogenetische Charakterisierung muriner B-Zell Lymphome	46
4.2	Die CFS-Expression in der murinen Translokationsbruchregion 5E5/F	55
4.3	Zytogenetische Kartierung von Maus-CFSs	55
4.3.1	Die CFS-Expression der Mausstämme BALB/c und C57BL/6	56
4.3.2	Vergleich der CFS-Expression in Maus und Mensch	60
4.4	Das menschliche CFS FRA7K	62
4.4.1	Molekular-zytogenetische Charakterisierung des murinen Fra12C1 und seines humanen Homologs FRA7K	62
4.4.2	Analyse der Bruchpunkte und CFSs auf Chromosom 7, insbesondere in 7q31	65
4.5	Molekular-zytogenetische Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von CFSs – Vergleich zwischen Maus und Mensch	70
4.6	Analyse möglicher struktureller Gemeinsamkeiten von CFS-exprimierenden Regionen	73
4.6.1	Evolutionäre Bruchpunkte	74
4.6.2	DNA-Helix-Flexibilität	76
4.6.3	Lange Sequenzabschnitte überspannende Gene	78
5	Diskussion	80
5.1	Murine ARF-defiziente Eμ-myc-B-Zell-Lymphome entwickeln in Abhängigkeit ihres INK4-Status spezifische zytogenetische Aberrationen mit prognostischer Relevanz	80
5.1.1	Unterschiedliche Mutationen am <i>INK4a/ARF</i> -Lokus bewirken gemeinsame und spezifische zytogenetische Aberrationen	80
5.1.2	Der Gewinn von Chromosom 6 ist mit einer verminderten, der von Chromosom 14 mit einer gesteigerten Therapierbarkeit von <i>ARF</i> -null-Lymphomen assoziiert	82
5.2	Translokationen an 5E5/F wurden nicht durch ein häufiges CFS verursacht	84
5.3	Die CFS-Expressionshäufigkeiten von Chromosomenbanden sind evolutionär konserviert	85
5.4	CFSs des menschlichen Chromosoms 7 kartieren nicht bevorzugt in Bruchpunkt-, „hot spots“	88
5.5	Die bisher untersuchten CFSs sind auf molekularer Ebene zwischen Maus und Mensch konserviert	90
5.6	Spezifische Eigenschaften grenzen CFSs von stabilen Regionen ab	91
6	Zusammenfassung	96
7	Abkürzungen	98
8	Literatur	99
	Publikationen	107
	Anhang	109

1 Einleitung

Die Tumorentstehung ist ein mehrstufiger Prozeß, welcher auf der Anhäufung (epi-) genetischer Veränderungen der DNA beruht. Ein grundlegendes Merkmal von Krebs ist die Klonalität, die Entwicklung der Tumore aus einer einzigen Zelle, welche beginnt, abnormal zu proliferieren. In der Folge entsteht eine Population klonaler Tumorzellen, in denen im Verlaufe der Tumorprogression weitere Mutationen auftreten. Einige dieser Veränderungen resultieren in einem selektiven Vorteil für die Zelle, z.B. durch beschleunigtes Wachstum. Nach mehreren Teilungen dominieren Zellen mit diesen Mutationen den Tumor. Die klonale Selektion setzt sich während der Tumorentwicklung fort, wodurch die Proliferationszeiten der Zellen weiter gesenkt werden und der Tumor an Malignität zunimmt (Cooper *et al.*, 2000).

Die genetischen Schäden können ererbt sein, spontan auftreten oder zum Beispiel durch Viren, UV-Licht oder chemische Stoffe induziert werden. Sie bewirken zum Beispiel eine Aktivierung kooperierender Onkogene oder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Onkogene sind veränderte Versionen normaler zellulärer Gene, die Protoonkogene genannt werden. Die Produkte der Protoonkogene sind an der Regulation des Zellwachstums beteiligt. Sie fungieren als Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Signaltransduktoren, Transkriptionsfaktoren und Regulatoren des programmierten Zelltods (Apoptose). Die Aktivierung der Protoonkogene kann unter anderem durch einen chromosomalen Umbau oder eine Genamplifikation zustande kommen. Chromosomale Umbauten, zu denen Translokationen und Inversionen zählen, können eine Aktivierung von Protoonkogenen durch Förderung der Transkription oder durch Genfusion zur Folge haben. Tumorsuppressorgene, welche ebenfalls an der Regulierung des normalen Zellwachstums beteiligt sind, werden durch Funktionsverlust beider Allele zum Beispiel durch Punktmutationen, Verkürzungen ihrer Proteinsequenz oder durch Deletionen des gesamten Allels inaktiviert.

Chromosomale Aberrationen humaner Neoplasien sind keineswegs zufällig über das Genom verteilt. Wir wissen bis heute nicht, wie und warum rekurrente strukturelle Chromosomenumbauten zustande kommen. Hierzu gibt es zwei grundlegende Theorien:

- 1) Chromosomale Umbauten finden zufällig statt. Durch Selektion werden diejenigen Zellen ohne proliferativen Vorteil eliminiert oder sie bleiben aufgrund ihrer geringen Anzahl unentdeckt.
- 2) Bestimmte Veränderungen geschehen bevorzugt und werden deshalb gehäuft gefunden. Viel diskutiert wird dabei eine Verbindung von Bruchstellen chromosomaler Umbauten in Tumorzellen mit Fragile Sites. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 1.3.1 genauer eingegangen.

1.1 Der Zellzyklus und seine Checkpoint-Regulation

Im Verlaufe des Zellzyklus entstehen aus einer Zelle zwei Tochterzellen. Dieser Prozeß ist essentiell für Wachstum und Zellerneuerung. Er ist ein grundlegendes Merkmal jeder Lebensform. Der Zellzyklus wird in zwei Phasen unterteilt: M (Mitose)-Phase und Interphase. Den Großteil der Zeit verbringen die Zellen in der Interphase, in welcher sie an Volumen zunehmen und ihre metabolischen Funktionen, wie Glukose-Oxidation, Transkription, Translation und DNA-Replikation ausüben. Die Interphase besteht aus G₁ (first gap)-, S (Synthese)- und G₂ (second gap)-Phase. G₁ ist der zeitliche Abschnitt, welcher auf die Mitose folgt; die DNA liegt in einfacher Form als Chromatid-Doppelstrang vor. Während der S-Phase findet die DNA-Replikation statt. G₂ ist die Periode zwischen der DNA-Synthese und dem Beginn der M-Phase. Am Ende von G₂ besteht jedes Chromosom aus zwei DNA-Doppelsträngen, welche durch das Zentromer miteinander verbunden sind. Zu diesem Zeitpunkt enthält der Nukleus die doppelte Menge der DNA aus G₁. Die Mitose-Phase wird in Prophase, Metaphase, Anaphase und Telophase gegliedert. In der Prophase löst sich die Kernmembran auf und die DNA kondensiert. Während der Metaphase ordnen sich die replizierten kondensierten Chromosomen in der Metaphaseplatte an. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden zu den gegenüberliegenden Spindelpolen gezogen, und in der Telophase schnürt sich die Zellmembran zusammen; es entstehen zwei Tochterzellen mit je einem Nukleus.

Der Zellzyklus muß vollständig abgeschlossen sein, bevor eine Zelle ein weiteres Zellzyklusprogramm beginnen kann. Der Prozeß unterliegt deshalb einer strengen Regulation. Fehler während des Zyklus bewirken entweder ein Verlangsamen bzw. Stoppen des Zellzyklus, wodurch die Reparatur des Schadens ermöglicht wird, oder das Induzieren von Apoptose. Diese Kontrollmechanismen passieren an sogenannten Checkpoints. Für das Ablaufen des Zellzyklus per se sind die Checkpoints nicht notwendig. Sie sichern aber das fehlerfreie Durchlaufen des Zyklus. Unterschiedliche Checkpoints „überwachen“ den Zellzyklus an verschiedenen Stellen. So dienen Replikations-Checkpoints einer akuraten DNA-Replikation und an mitotischen Checkpoints wird die Chromosomensegregation und die Zellteilung kontrolliert. Defekte an Checkpoints, zum Beispiel Mutationen in *INK4a/ARF* (siehe Kapitel 1.2), beeinflussen die Initiierung und Progression von Tumoren. Die Signalwege der Checkpointproteine bilden komplexe Netzwerke mit der nötigen Redundanz, um ein stabiles System zur Fehlerbehebung aufrechtzuerhalten (Hanahan & Weinberg, 2000; Nyberg *et al.*, 2002).

1.2 INK4a und ARF

1.2.1 Ein Genlokus – zwei Tumorsuppressorproteine

Die chromosomale Region 9p21 ist in einer Vielzahl humaner Tumoren in Inversionen, Translokationen und heterozygote oder homozygote Deletionen involviert. Der *CDKN2A*-Lokus auf 9p21 zählt zu den am häufigsten mutierten Regionen in malignen Zellen (Ruas

& Peters, 1998; Sherr, 2001a). Zwei Gene mit überlagerten Leserastern kodieren an dieser Stelle für die Proteine INK4a (Inhibitor of CDK4) und ARF (alternative reading frame). INK4a, auch als p16 bekannt, blockiert die Phosphorylierung des Proteins pRb durch die Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und induziert somit einen G₁-Zellzyklusarrest. Das ARF Protein (humanes p14 ebenso wie das p19 der Maus) stabilisiert den Apoptoseinduktor p53, indem es dessen Inhibitor MDM2 bindet und inhibiert. Die beiden Transkripte des *CDKN2A*-Lokus werden durch zwei eigenständige Promotoren reguliert (Quelle *et al.*, 1995). Wie Abbildung 1.2.1 verdeutlicht, unterscheiden sie sich zudem in ihren 5'-Exons; E1-alpha kodiert für INK4a und E1-beta für ARF. Exons E2 und E3 gehören beiden Tumorsuppressoren an. Eine homozygote Mutation von *CDKN2A* stört daher sowohl den pRb- als auch den p53- regulierten Signaltransduktionsweg (Zhang *et al.*, 1998; Sherr, 2001a).

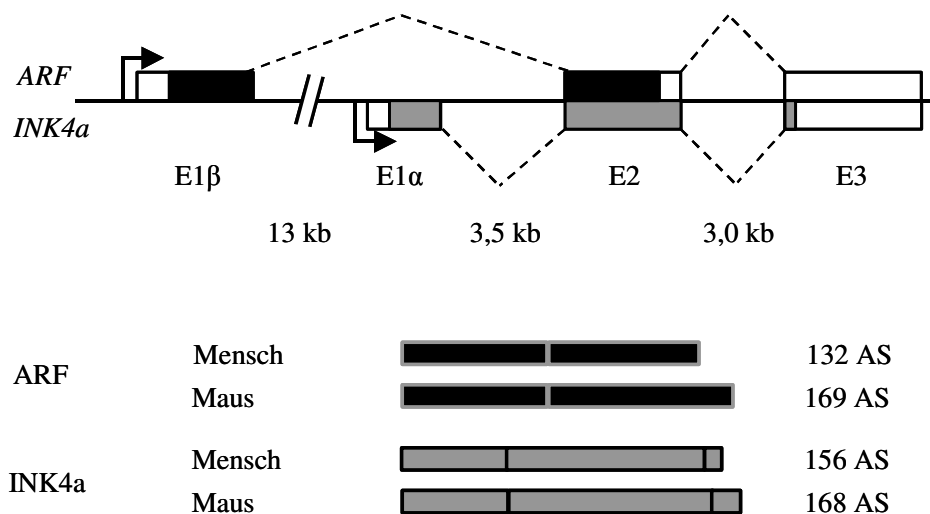


Abbildung 1.2.1 Struktur des *INK4A/ARF*-Lokus. Der humane *CDKN2A*-Lokus und seine Genprodukte, kombinierte Darstellung aus Ruas & Peters, 1998 und Sharpless & DePinho, 1999. Die für ARF kodierenden Bereiche sind schwarz, die des INK4a sind grau dargestellt. Die Größe der Introns ist angegeben. Die Transkription wird an spezifischen Promotoren initiiert und erfolgt in überlagerten Leserastern. Nach alternativem Splicing entstehen die beiden Transkripte. Unterhalb der Genkarte sind Aufbau und Größe der entsprechenden Proteine des Menschen und der Maus dargestellt (AS, Aminosäuren).

Deletionen, die beide Transkripte betreffen, wurden in einer Vielzahl von hämatologischen und soliden Tumoren nachgewiesen. (Ruas & Peters, 1998; Sharpless & DePinho, 1999). Zum Beispiel war das Exon 2 in 25% der untersuchten Fälle kindlicher Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL) homozygot und in 13% hemizygot deletiert (Carter *et al.*, 2001b). Lange Zeit beschränkte man die Analyse des *CDKN2A*-Lokus auf Mutationen, welche im Verlust beider Genprodukte resultieren. Neuere Studien beschrieben neben häufigen Mutationen, beider *CDKN2A*-Gene auch Punktmutationen, kleinere Deletionen und Promotorhypermethylierungen, die spezifisch in INK4a oder ARF auftraten (Labuhn *et al.*, 2001; Grutten *et al.*, 2001; Viswanathan *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001; Randerson-Moor *et al.*, 2001; Bertin *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003). Diese

Erkenntnisse deuten auf eigenständige Funktionen der beiden Proteine als Tumorsuppressoren hin.

Darüberhinaus stellt der Verlust der *CDKN2A*-Genprodukte einen prognostischen Indikator für geringe Behandlungserfolge dar. Faderl *et al.* beobachteten in Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie (AML) ein beschleunigtes Auftreten von Rezidivtumoren nach Behandlung, wenn der Primärtumor *INK4a/ARF*-Deletionen aufwies (Faderl *et al.*, 2000). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der kindlichen ALL dokumentiert, wo 50% der behandelten Patienten mit homozygoter oder heterozygoter Exon 2-Deletion im Primärtumor innerhalb von 2 Jahren ein Rezidiv entwickelten. Im Gegensatz dazu waren über 60% der Patienten ohne Deletion nach 8 Jahren Beobachtungsdauer noch tumorfrei (Carter *et al.*, 2001b).

Um ein besseres Verständnis der Funktionen von INK4a und ARF als mögliche Tumorsuppressoren zu erlangen, wurden Mäuse mit verschiedenen Mutationen am *Cdkn2a*-Lokus generiert. In der Maus befindet sich *INK4a/ARF* innerhalb der chromosomalen Bande 4C4. Der Verlust der beiden *Cdkn2a*-Produkte, p16(INK4a) und p19(ARF), führte zu einer frühzeitigen Entstehung von Lymphomen und Fibrosarkomen (Serrano *et al.*, 1996). Die Zerstörung von *ARF* bei intaktem *INK4a* bewirkte ebenfalls das Auftreten eines breiten Spektrums von Tumoren, z.B. von Sarkomen, Lymphomen, Karzinomen und Tumoren des Nervensystems (Kamijo *et al.*, 1997; Kamijo *et al.*, 1999). Dieses Ergebnis stimmte mit den klinischen Beobachtungen an Krebspatienten mit einer Keimbahn-Deletion von *ARF* überein (Randerson-Moor *et al.*, 2001). Die Funktion von ARF als eigenständiger Tumorsuppressor wurde damit bestätigt.

Die Generierung von *INK4a*null Mäusen mit intaktem ARF wurde parallel von zwei unterschiedlichen Gruppen durchgeführt. Krimpenfort *et al.* fügten in Exon 2 eine Punktmutation ein, welche im *ARF*-Leseraster stumm bleibt aber in *INK4a* zu einem verfrühten Stop Codon führt (Krimpenfort *et al.*, 2001). Das analoge humane Allel dieser Mutation tritt real in einer Vielzahl humaner Tumortypen auf. In diesem Mausmodell erhöhte die Mutation in *INK4a* selbst im homozygoten Zustand nicht das Risiko für das Auftreten von Tumoren. Die Autoren schlußfolgerten daraus, daß bei einer Deletion in *Cdkn2a* der Verlust von ARF und nicht der von INK4a die Tumorentstehung fördert. Sharpless *et al.* hingegen mutierten *INK4a* durch die Deletion des Exons 1 α und beschrieben eine erhöhte Inzidenz spontaner und Karzinogen-induzierter Tumore (Sharpless *et al.*, 2001; Sherr, 2001b). Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse dieser beiden Studien bleibt ungeklärt, inwieweit INK4a als eigenständiger Tumorsuppressor fungiert.

Einige klinische Studien an menschlichen sowie an Mauszellen gaben Hinweise darauf, daß die *INK4a/ARF*-Genprodukte, wie auch das von *p53*, als Mediatoren in Signaltransduktionsketten fungieren, welche bei einer Aktivierung von Onkogenen dem unkontrollierten Wachstum der Zellen entgegenwirken (el Rouby *et al.*, 1993; Newcomb, 1995; Ichikawa *et al.*, 1997; Maloney *et al.*, 1999; Rosenwald *et al.*, 2003). Abbildung 1.2.2 stellt schematisch die bisherigen Erkenntnisse über diese Signaltransduktionswege dar. Während bestimmte aktivierte Onkogene eher eine ARF-vermittelte zelluläre Antwort bewirken, lösen andere wiederum eine Reaktion aus, an welcher vornehmlich INK4a beteiligt ist. So führt zum Beispiel aktiviertes c-myc zu einer Induktion von ARF und der daraus resultierenden p53-bedingten Apoptose (Zindy *et al.*, 1998; Jacobs *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2002). Ras dagegen ruft typischerweise einen vorzeitigen Seneszenz-ähnlichen Arrest hervor, welcher durch eine Hochregulierung von INK4a vermittelt wird

(Serrano *et al.*, 1997; Brookes *et al.*, 2002). INK4a wird ebenfalls als Folge von DNA-Schädigung zum Beispiel durch Röntgen-Bestrahlung oder Chemotherapeutika induziert (Robles & Adami, 1998; Suzuki *et al.*, 2001; Schmitt *et al.*, 2002). Betrachtet man die Eingebundenheit von INK4a und ARF in Apoptose und Seneszenz als ultimative Programme zum Schutz vor unkontrolliertem Wachstum, könnte ihre selektive Ausschaltung sowohl während der Tumorentstehung als auch bei der Entwicklung von Therapieresistenzen bedeutsam sein.

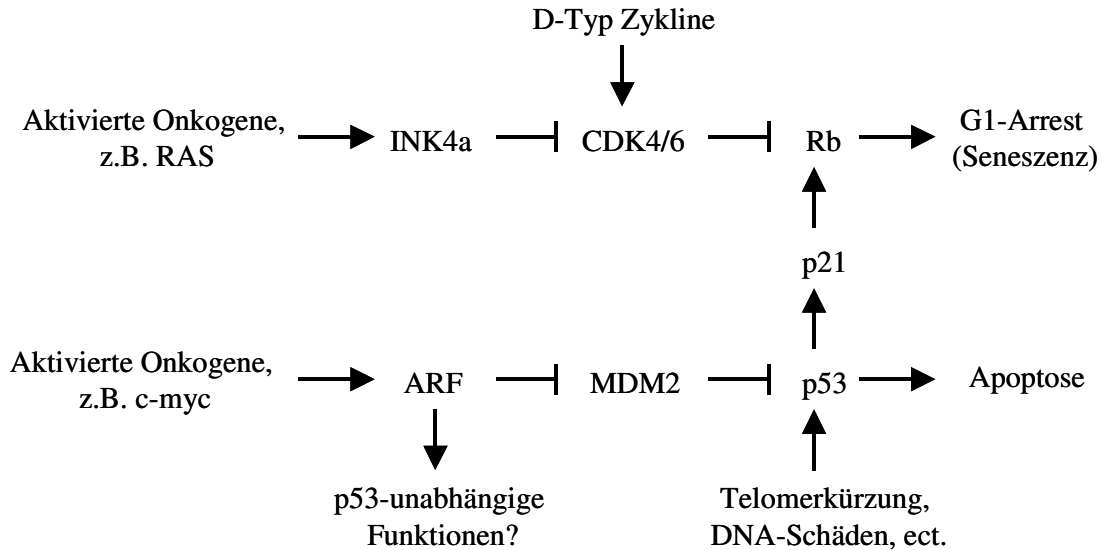


Abbildung 1.2.2 Seneszenz und Apoptose als Folge der Funktion von INK4a und ARF, (aus Sharpless & DePinho, 2004). Die Induktion von INK4a erfolgt als zelluläre Antwort auf aktivierte Onkogene wie RAS. INK4a blockiert die Bindung von Zyklinen des D-Typs an die Kinasen CDK4 und CDK6. Damit wird die Phosphorylierung von Rb durch CDK4/6 inhibiert. Hypophosphoryliertes Rb bindet E2F und blockiert die G₁/S-Progression der Zelle. Hypophosphorylierung von Rb und Seneszenz wird ebenfalls durch p21 bewirkt, dessen Expression von p53 stimuliert wird. P53 induziert neben Seneszenz auch Apoptose. Im streßfreien Zustand bewirkt MDM2 eine schnelle Degradierung des p53-Proteins; dieser Prozeß wird von ARF inhibiert. p53 kann als Antwort auf genotoxischen Streß phosphoryliert werden, wodurch seine Interaktion mit MDM2 inhibiert und p53 stabilisiert wird.

Um ein besseres Verständnis über die Bedeutung von INK4a und ARF für das therapeutische Ansprechen von Tumoren zu erlangen, wurden in den letzten Jahren in der Arbeitsgruppe von Scott Lowe (CSHL, Cold Spring Harbor, NY) Untersuchungen am *Eμ-myc* transgenen Mausmodell mit gezielten Mutationen in *INK4a/ARF* (Deletion des Exon 1β oder der Exons 2 und 3) durchgeführt (Schmitt *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 2002). *Eμ-myc*-Mäuse exprimieren in der B-Zell-Linie konstitutiv das Protoonkogen c-myc und entwickeln B-Zell-Lymphome mit assoziierter Leukämie (Adams *et al.*, 1985). Während die Latenzzeit bei den *Eμ-myc*-Kontrollen 139 Tage betrug, traten in den Kreuzungen *Eμ-myc / INK4a/ARF*+/- und *Eμ-myc / ARF*+/- bereits nach 34 bzw. 47 Tagen Tumore auf. Mittels molekularer Analyse wurde in 88% der Lymphome von *INK4a/ARF*+/- -Tieren der Verlust des zweiten Allels detektiert (Schmitt *et al.*, 1999). Die Tumore aus dem *ARF*+/- -Hintergrund wiesen zu 65% eine homozygote Deletion des Exon 1β auf; in den übrigen

Fällen zeigte die Southern blot-Analyse einen heterozygoten Verlust des Exons 2, und das ARF-Protein wurde in 17/17 untersuchten Tumoren verloren gefunden (Schmitt *et al.*, 2002). Anhand dieses Modellsystems konnten somit Lymphome mit spezifischen Verlusten beider Allele entweder von ARF oder INK4a/ARF generiert werden. Durch die zusätzliche Aktivierung des Onkogens c-myc sollte eine möglichst geringe genetische Varianz zwischen den Tumoren erreicht werden. In ihren Studien konnten die Autoren aufzeigen, daß die zelluläre Antwort der murinen Lymphome auf eine Chemotherapie über ein von p53 und INK4a kontrolliertes Seneszenz-Programm geschieht. Der Erfolg einer Cyclophosphamid-Therapie war bei Tumoren mit *p53*- oder *INK4a/ARF*-Mutationen sehr gering. *ARF*null-Lymphome mit intaktem INK4a erzielten dagegen deutlich bessere Behandlungsergebnisse. Von sieben Rezidiv-Tumoren, bei denen im *ARF*null-Primärtumor INK4a noch intakt war, zeigten fünf eine Deletion des *INK4a*-Gens (Schmitt *et al.*, 2002). Diese Therapie-bedingte Selektion gegen *INK4a* im Mausmodell entspricht den klinischen Beobachtungen bei kindlicher ALL. Dort wiesen die Rezidivtumore von 50% der Patienten, deren primäre Leukämien ohne homozygote Deletion des Exons 2 waren, eine solche homozygote Deletion auf (Carter *et al.*, 2001a).

Trotz des erlangten Wissens über die prognostische Bedeutung von Defekten am *INK4a/ARF*-Lokus bleiben die Therapieerfolge heterogen. Das trifft auch für die Mauslymphome zu, welche in die Subgruppen *INK4a/ARF*null bzw. *ARF*null eingeteilt wurden. Es ist daher zwingend notwendig, die Bedeutung zusätzlicher genetischer Läsionen in ihrer Auswirkung auf die therapeutische Ansprechbarkeit von *INK4a/ARF* defizienten Tumoren zu bestimmen. Deshalb untersuchten wir das *Eμ-myc* / *INK4a/ARF*+/- bzw. *ARF*+/- transgene Mausmodell von Schmitt *et al.*, um mittels genomweiter molekular-zytogenetischer Methoden die chromosomalen Aberrationen der primären Lymphome unter Berücksichtigung der Therapieergebnisse detailliert zu charakterisieren.

1.2.2 Generierung und Klassifizierung der in dieser Arbeit analysierten Lymphome

Abbildung 1.2.3 stellt den kompletten Versuchsaufbau zur Analyse chromosomaler Aberrationen in *INK4a/ARF*null- bzw. *ARF*null-Tumoren und deren Relevanz als prognostische Marker schematisch dar. Das Projekt wurde in Kooperation mit Schmitt *et al.* bearbeitet. Wie bereits in Kapitel 1.2.1 beschrieben, verwendeten Schmitt *et al.* das *Eμ-myc*-transgene Mausmodell, um B-Zell-Lymphome mit definierten genetischen Läsionen zu erzeugen. Mäuse mit einer heterozygoten Deletion des *CDKN2A* Exons 1β - wobei gezielt die Expression von ARF verhindert war - bzw. Mäuse mit einem Verlust der Exons 2 und 3 - beide *INK4a/ARF*-Genprodukte betreffend - wurden mit *Eμ-myc*-transgenen Tieren gekreuzt. Bei den Nachkommen war der *INK4a/ARF*-Lokus intakt, oder er wies einen heterozygoten Defekt in entweder Exon 1β oder den Exons 2/3 auf. Die c-myc überexprimierenden Tiere entwickelten Lymphome, deren Zellen durch das Isolieren der vergrößerten Lymphknoten gewonnen wurden.

Die mittlere Tumorlatenz betrug bei den *INK4a/ARF*+/- -Tieren 32 (± 5) Tage, bei den *ARF*+/- -Tieren 51 (± 18) Tage und bei den *INK4a/ARF*+/+ -Tieren 109 (± 56) Tage. Somit entwickelten die *INK4a/ARF*+/- -Mäuse signifikant schneller Lymphome als die *ARF*+/- - und *INK4a/ARF*+/+ -Mäuse; der P-Wert, errechnet mit Hilfe des Mann-Whitney

U-Tests, war $P = 0,0026$ im Vergleich zu $ARF+/-$ - und $P = 0,0002$ im Vergleich zu $INK4a/ARF+/+$ -Tieren. Die Lymphome der $ARF+/-$ -Mäuse entstanden signifikant schneller als die der $INK4a/ARF+/+$ -Tiere ($P = 0,0007$).

Anhand *CDKN2A*-Exon-spezifischer Multiplex-PCR und ARF-Immunoblot-Analysen wurden die Tumore hinsichtlich ihres *INK4a/ARF*-Status klassifiziert. Als Positivkontrolle wurden hierfür *c-myc*-transgene *p53*null-Zellen genutzt, da diese keinem Selektionsdruck gegen ARF unterlagen.

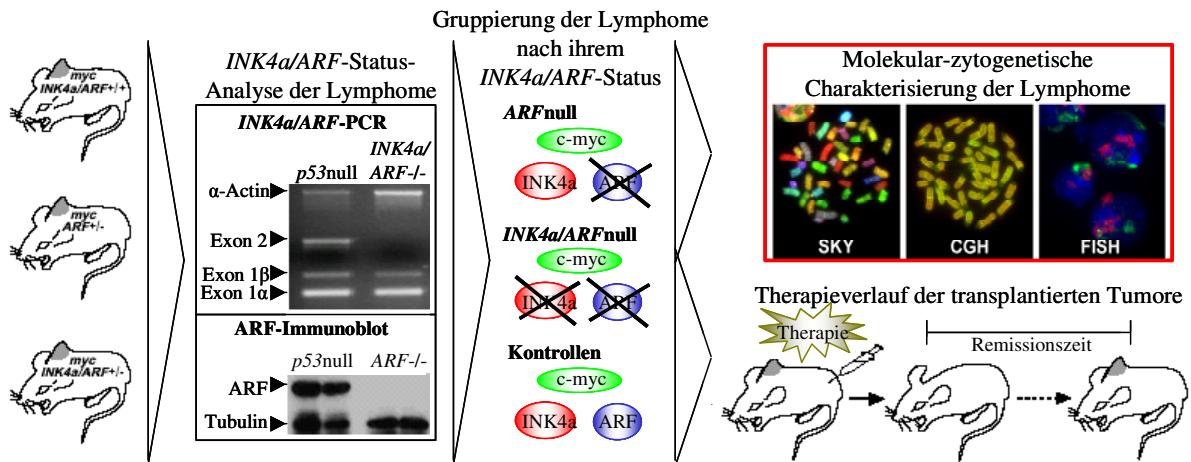


Abbildung 1.2.3 Schema des Versuchsaufbaus. *Eu-myc* transgene Mäuse mit intaktem *INK4a/ARF*-Lokus oder mit heterozygoten Deletionen in *ARF* oder *INK4a/ARF* entwickelten Lymphome (dargestellt als graue Erhebung im Nacken). Isolierte Lymphomzellen durchliefen eine *INK4a/ARF*-Statusbestimmung durch *INK4a/ARF*-Exon-spezifische Multiplex-PCR und ARF-Immunoblot (Schmitt *et al.*, 2002). *ARF*null-, *INK4a/ARF*null-, oder Kontrolllymphome wurden in dieser Arbeit molekular-zytogenetisch anhand von SKY-, CGH- und FISH-Experimenten analysiert. Ein zweiter Teil der Lymphomzellen wurde in nicht-transgene Empfängermäuse transplantiert, welche daraufhin Lymphome entwickelten. Die tumortragenden Empfängermäuse wurden chemotherapeutisch behandelt und der Therapieverlauf wurde mit den zytogenetischen Aberrationen der Primärtumore verglichen.

In nahezu allen Lymphomen (13/14 Fälle) aus *c-myc*-transgenen $ARF+/-$ Mäusen wurde ein homozygoter Verlust des *ARF*-spezifischen Exons 1 β oder ein Fehlen des ARF-Proteins detektiert. Die Expression des INK4a-Proteins blieb in diesen primären *ARF*null-Lymphomen erhalten (3/3 getestete Fälle). Eines der aus dem $ARF+/-$ Hintergrund entstandenen Lymphome wies eine biallelische Deletion des Exons 2 und damit den Verlust beider *CDKN2A*-Produkte auf (Fall A2). Der Fall A2 wurde daraufhin als *INK4a/ARF*null-Lymphom klassifiziert (siehe Tabelle 4.1).

In 11 von 13 Tumoren der transgenen *INK4a/ARF+/-* -Mäuse wurde mittels der genomischen *INK4a/ARF*-Multiplex-PCR der homozygote Verlust des Exons 2 gezeigt (*INK4a/ARF*null-Tumore). Für die beiden Lymphome mit einem positiven PCR-Signal für Exon 2 wurde mit Hilfe eines ARF-Western blots der Verlust der ARF-Protein-Expression detektiert (Fälle IA3 und IA7, gruppiert als *ARF*null).

Lymphome aus dem *INK4a/ARF* intakten Hintergrund waren häufig defizient für beide *INK4a/ARF*-Genprodukte. In fünf von 11 Fällen wurde eine homozygote Deletion des Exons 2 gefunden; sie waren *INK4a/ARF*null. Keines der Lymphome der *INK4a/ARF+/+* -

Tiere wies eine homozygote Deletion am ARF-spezifischen Exon 1 β oder am INK4a-spezifischen Exon 1 α auf. Somit waren sechs Fälle weder *INK4a/ARF*null noch *ARF*null.

Aufgrund der *INK4a/ARF*-Statusergebnisse wurden 15/38 Tumore als *ARF*null, 17/38 als *INK4a/ARF*null, und die übrigen 6/38 als Kontrollen klassifiziert (vergleiche Tabelle 4.1).

Das Tumormaterial der 38 Mäuse wurde geteilt. Ein Teil wurde gesunden Empfänger-mäusen ohne Transgen in die Schwanzvenen injiziert. Die Tiere entwickelten daraufhin Lymphome, welche dem primären Tumor histopathologisch glichen (Schmitt *et al.*, 1999) und wurden Therapiestudien zugeführt.

Aus dem zweiten Teil wurden Metaphasechromosomen präpariert und genomische DNA gewonnen. Dieses Material wurde uns von Schmitt *et al.* bereitgestellt und diente als Basis für die von uns durchgeführten molekular-zytogenetischen Analysen der Primärtumore.

1.3 Common Fragile Sites (CFSs)

Der Begriff CFS-Expression beschreibt im Folgenden das Auftreten sichtbarer CFSs in Metaphasechromosomen. Es wurden keine Studien zur Bestimmung der RNA-Expression durchgeführt.

1.3.1 Grundlagen zu Fragile Sites

Als Fragile Sites bezeichnet man chromosomale Regionen, welche nach Induktion oder seltener auch spontan bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Metaphasen als Chromatidlücke oder Chromosomenbruch in Erscheinung treten. Diese Lücken und Brüche treten nicht zufällig über das Genom verstreut, sondern vorzugsweise in bestimmten Chromosomenbanden auf. Nach der Häufigkeit ihres Auftretens und der Art ihrer Induzierbarkeit unterscheidet man Rare Fragile Sites (RFSs) und Common Fragile Sites (CFSs). RFSs werden *in vitro* durch Folat- oder Thymidinmangel induziert, sie wurden in weniger als 5% der Bevölkerung nachgewiesen und stellen ein Merkmal bestimmter genetischer Erkrankungen dar. Hervorgerufen wird die Fragilität dieser Stellen durch die mehrfache Tandemamplifikation von Trinukleotiden oder AT-reichen Minisatelliten. Im Beispiel des Fragilen X-Syndroms, auch Martin-Bell-Syndrom genannt, tragen Patienten 200 bis 2000 Kopien des (CGG)-Trinukleotids im 5'-untranslatierten Bereich des *FMRI*-Gens, was zu einer Methylierung des Promotors und somit zum Abschalten des *FMRI*-Gens führt. Im Vergleich dazu enthalten die *FMRI*-Gene gesunder Personen nur 10 bis 50 (CGG)-Kopien. Repeatverlängerungen bis zu 200 Triplets bezeichnet man als Prämutation. Ein männlicher Überträger vererbt sein prämutiertes *FMRI*-Gen normalerweise nicht an seinen Sohn - weil das *FMRI*-Gen auf dem X-Chromosom liegt - aber an jede Tochter. Anders als bei den Töchtern von Überträgerinnen tritt die Vollmutation bei den Töchtern männlicher Überträger nicht auf. Die Expansion

eines prämutierten (CGG)-Repeats zum vollmutierten Krankheits-Allel geschieht vermutlich bei der mitotischen Proliferation der diploiden prämeiotischen Oogonien im Ovar von Überträgerinnen.

CFSs werden durch den Zusatz von Chemikalien wie Aphidicolin (APC), 5-Azacytidin oder Bromodeoxyuridine (BrdU) zum Zellkulturmedium sichtbar gemacht und wurden in allen untersuchten Probanden induziert. Dabei handelt es sich überwiegend um gesunde Individuen ohne einen krankheitsassoziierten Phänotyp. Die Fragilität bewirkt, abgesehen von den Lücken im Chromatin, auch das Auftreten von azentrischen Chromosomenstücken, partiell deletierten Chromosomen und triradialen Figuren. Da diese Chromatinlücken und Brüche zumindest als seltene Ereignisse in nahezu allen unterscheidbaren Chromosomenbanden zu finden sind, wurden diejenigen Banden als CFS beschrieben, deren Lücken/Bruch-Expression signifikant über dem Durchschnittswert für eine Bande lag (Mariani, 1989; Tedeschi *et al.*, 1992; Bohm *et al.*, 1995; Denison *et al.*, 2003b).

Innerhalb der bisher untersuchten Population variiert die Häufigkeit der Lücken und Brüche in den spezifischen Chromosomenbanden (Denison *et al.*, 2003b und Karen Stout-Weider, persönliche Mitteilung). Sie wird vermutlich zumindest teilweise von Umwelteinflüssen - etwa der Aufnahme von Karzinogenen - bestimmt. So konnten Stein *et al.* eine signifikante Korrelation zwischen der Aufnahme von Zigarettenrauch und einer gesteigerten generellen CFS-Expression in Lymphozytenzellen, verglichen mit Zellen von Nichtrauchern, aufzeigen (Stein *et al.*, 2002). Von besonderer Bedeutung ist die Annahme, wonach CFSs und Bruchpunkte von Tumor-assoziierten Chromosomenanomalien gehäuft in denselben Banden auftreten (Popescu, 2003). Diese Hypothese beruht auf den Ergebnissen dreier Veröffentlichungen. Yunis *et al.* beschrieben, daß von 41 Bruchpunkten struktureller Chromosomenanomalien aus Leukämien, Lymphomen und soliden Tumoren 20 (50%) in einer von 51 Banden liegen, welche ein CFSs exprimieren (Yunis & Soreng, 1984). Ein ähnliches Ergebnis erzielten De Braekeleer *et al.* bei der Beschränkung des Vergleichs auf chromosomale Banden, welche signifikant vermehrt in Umbauten in hämatologischen und soliden Tumoren involviert gefunden wurden. Die Hälfte der 23 zu diesem Zeitpunkt bekannten Fragile Sites kartierten in eine dieser Banden (De Braekeleer *et al.*, 1985). Carme *et al.* untersuchten an T-Lymphozyten gesunder Personen APC-bedingte chromosomale Aberrationen, indem sie dem Wachstum unter APC einen weiteren Zellzyklus in APC-freiem Medium folgen ließen. 61,9% der 181 Bruchpunkte lagen in CFS-Banden. 34 von 61 beobachteten Deletionen (55,7%) lagen in Banden welche ebenfalls in verschiedenen Tumoren Deletionen aufwiesen; jedoch konnte keine der 47 Translokationen einer bisher in Tumoren bekannten Translokation zugeordnet werden. 28 von 42 Bruchpunkten in dizentrischen Chromosomen lagen in Banden, in denen DNA-Amplifikationen in einer Vielzahl von Tumoren eines breiten Spektrums, zusammengefaßt aus insgesamt 113 Publikationen, beschrieben wurden (Carme *et al.*, 1999).

In den Banden mit häufiger CFS-Expression wurde außerdem eine erhöhte Rate von Schwesterchromatid-Austauschen beobachtet (Glover & Stein, 1987; Hirsch, 1991).

Aus der Summe dieser Beobachtungen ergibt sich die Hypothese, daß CFSs geeignete „hot spots“ für die Entstehung struktureller tumorspezifischer Chromosomenaberrationen sind.

Die molekular-zytogenetische Lokalisierung von 12 CFSs (FRA2G, FRA3B, FRA4F, FRA6E, FRA6F, FRA7E, FRA7G, FRA7H, FRA7I, FRA9E, FRA16D und FRAXB) hat gezeigt, daß die Aphidicolin-induzierte Dekondensierung / Brüchigkeit innerhalb

ausgedehnter genomischer Regionen auftritt, die in einer Größenordnung von über 500 kb bis zu 10 Mb liegt (siehe Tabelle 1.3). Die einzelnen Chromatinlücken wurden innerhalb dieser Regionen jeweils an variablen Positionen beobachtet. (Wilke *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1998b; Mishmar *et al.*, 1998; Mangelsdorf *et al.*, 2000; Arlt *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 2002; Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003; Callahan *et al.*, 2003; Rozier *et al.*, 2004). Für neun der zwölf klonierten CFSs konnte eine Verbindung zu krebsspezifischen Deletionen, Heterozygotieverlust und / oder ein Genexpressionsverlust gezeigt werden (Boldog *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Mangelsdorf *et al.*, 2000; Paige *et al.*, 2000; Arlt *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2002; Callahan *et al.*, 2003; Denison *et al.*, 2003c; Ishii *et al.*, 2003; Rozier *et al.*, 2004). Mit Hilfe molekularer Kartierungen an primären Tumorzellen und Tumor-Zelllinien wurden Bruchpunkte von Translokationen und homozygoten oder heterozygoten Deletionen in den Regionen der CFSs detektiert. Ebenso wurden größere Deletionen beschrieben, welche über die Grenzen der CFSs reichten. Zwei CFSs wurden tumorspezifische Amplifikationsbruchpunkte überspannend gefunden (Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002). Auf dieser Beobachtung beruht die Vermutung, wonach die Brüchigkeit der CFSs die Entstehung von Onkogenamplifikationen begünstigt. Zur Erklärung dieses Phänomens wird der Mechanismus des Bruch-Fusion-Brücken-Zyklus (breakage-fusion-bridge cycle, BFB) beschrieben (dargestellt in Abbildung 1.3.1). Nach diesem Modell erzeugt ein initialer Chromatidbruch (breakage) zwischen einer Zielregion (z.B. einem Onkogen) und dem Telomer ein Chromatid mit offenem, ungeschütztem Ende. Nach Durchlaufen einer Replikationsrunde wird das gebrochene Chromosomenende durch Schwesterchromatidfusion repariert. Das entstandene dizentrische Chromosom, bei dem die Zielsequenz mit ihrer replizierten Kopie durch die Fusionsstelle verbunden ist, bildet während der Mitose eine Brücke (bridge) zwischen den beiden Zellpolen aus und bricht aufgrund des gegenläufigen Zuges des Spindelapparates auf die beiden Zentromere. Findet der Bruch zentromerisch zur Zielsequenz statt, so wird die Region zwischen den beiden Bruchereignissen dupliziert. Mehrfache Wiederholungen des Kreislaufs von Fusionen und Brüchen können schließlich zu einer intrachromosomalen Amplifikation führen. Solche rekurrenten Bruchstellen, die das Ende der amplifizierten Region markieren, wurden in CFS-exprimierenden chromosomalen Bereichen von humanen Zellen (Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002) und Hamsterzelllinien (Kuo *et al.*, 1994; Coquelle *et al.*, 1997) beschrieben.

Tabelle 1.3 Zusammenfassung des Wissensstandes über die 12 bisher molekular untersuchten menschlichen CFSs

CFS	Position	Größe (Mb)*	Gene (>500kb)* in Mb	beschriebene Aberrationen in Tumoren und weiteren Erkrankungen	Regionen erhöhter DNA-Helix-Flexibilität	homologes Maus-CFS
FRA2G (Limongi <i>et al.</i> , 2003)	2q31	> 1	-	n.b.	ja (Limongi <i>et al.</i> , 2003) #	n.b.
FRA3B (Wilke <i>et al.</i> , 1996; Becker <i>et al.</i> , 2002)	3p14.2	~ 4	FHIT (1,5), PTPRG (0,7)	Deletionen oder inaktiviertes Protein in vielen Tumoren (Huebner & Croce, 2001; Huang <i>et al.</i> , 2003; Ishii <i>et al.</i> , 2003)	ja (Mimori <i>et al.</i> , 1999; Mishmar <i>et al.</i> , 1998; Matsuyama <i>et al.</i> , 2003) #	Fra14A2 (Glover <i>et al.</i> , 1998; Shiraishi <i>et al.</i> , 2001)
FRA4F (Rozier <i>et al.</i> , 2004)	4q22	> 8	GRID2 (1,5)	LOH in Lebertumoren, Deletionen in Gebärmutterhalskrebs (Rozier <i>et al.</i> , 2004)	ja (Rozier <i>et al.</i> , 2004) #	Fra6C1 (Rozier <i>et al.</i> , 2004)
FRA6E (Denison <i>et al.</i> , 2003a)	6q26	~ 3,2	PARK2 (1,4), PACRG (0,6)	Duplikationen, Deletionen und runterregulierte Genexpression in Ovarialtumoren und beim autosomalen rezessiven juvenilen Mb. Parkinson (Denison <i>et al.</i> , 2003c)	n.b.	n.b.
FRA6F (Morelli <i>et al.</i> , 2002)	6q21	> 1,2	-	Deletionsbruchpunkte in vielen Tumoren (Morelli <i>et al.</i> , 2002)	ja (Morelli <i>et al.</i> , 2002) ##	n.b.
FRA7E (Zlotorynski <i>et al.</i> , 2003)	7q21.11	> 4,5	-	n.b.	erhöht gegenüber nichtfragilen Regionen (Zlotorynski <i>et al.</i> , 2003) ###	n.b.
FRA7G (Huang <i>et al.</i> , 1998a; Hellman <i>et al.</i> , 2002)	7q31.2	> 4	FOXP2 (0,6)	LOH in Ovarial-, Brust- und Prostatumoren und Onkogen-Amplifikation in einer Darmkarzinom-Zelllinie (Huebner & Croce, 2001; Hellman <i>et al.</i> , 2002)	ja (Mishmar <i>et al.</i> , 1998)	n.b.
FRA7H (Mishmar <i>et al.</i> , 1998)	7q32.3	~ 3,8	SEC8 (0,8)	n.b.	ja (Mishmar <i>et al.</i> , 1998)	n.b.
FRA7I (Ciullo <i>et al.</i> , 2002)	7q35	~ 1,5	CNTNAP2 (2,3)	involviert in onkogenen Duplikationen und alternativen Transkripten in Brusttumoren (Ciullo <i>et al.</i> , 2002; Debily <i>et al.</i> , 2004)	erhöht gegenüber nichtfragilen Regionen (Ciullo <i>et al.</i> , 2002; Zlotorynski <i>et al.</i> , 2003) #; ###	n.b.
FRA9E (Callahan <i>et al.</i> , 2003)	9q32	> 9,8	-	LOH in Ovarialtumoren (Callahan <i>et al.</i> , 2003)	n.b.	n.b.
FRA16D (Krummel <i>et al.</i> , 2000; Mangelsdorf <i>et al.</i> , 2000)	16q23.2	~ 2	WWOX (1,1)	LOH, Deletionen oder Translokationen in vielen Tumoren (Huebner & Croce, 2001; Ishii <i>et al.</i> , 2003)	eine (Ried <i>et al.</i> , 2000; Krummel <i>et al.</i> , 2002) #	FRA8E1 (Krummel <i>et al.</i> , 2002)
FRAXB (Arlt <i>et al.</i> , 2002)	Xp22.31	~ 0,5	-	deletiert in einigen Tumoren (Arlt <i>et al.</i> , 2002)	n.b.	n.b.

*UCSC Version vom Mai 2004

Analyse mittels FlexStab von Dr. B. Kerem's Website:

<http://leonardo.ls.huji.ac.il/departments/genesite/faculty/bkerem.html>

```
## Analyse mittels bend.it Programm
```

Analyse mittels TwistFlex (<http://www.jail.cs.huji.ac.il/~netab/Download.html>)

n.b. nicht bekannt

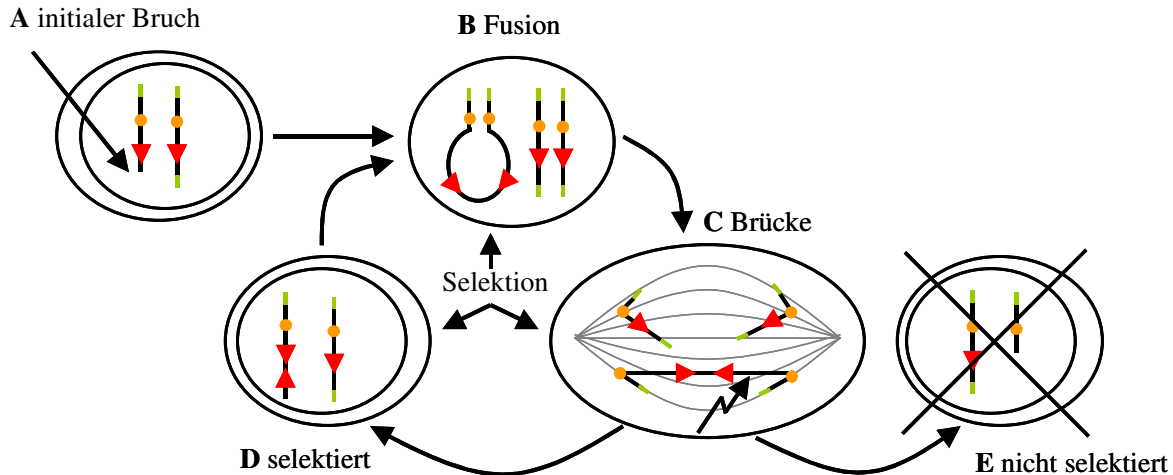


Abbildung 1.3.1 Schematische Darstellung der Genamplifikation durch den Bruch-Fusion-Brücken (BFB)- Zyklus, modifiziert nach Hellman *et al.*, 2002. Rote Dreiecke stellen das Amplikon dar; orange Kreise symbolisieren Zentromere; grüne Balken stehen für Telomere. (A): Interphase — ein initialer Bruch führt zur Entstehung eines offenen Chromatidendes. (B): Metaphase — die Fusion zweier ungeschützter Schwesterchromatidenden resultiert in einem dizenstrischen Chromosom. (C): Anaphase — das dizenstrische Chromosom bildet eine Brücke zwischen den gegensätzlichen Polen aus. Durch einen Bruch in dem Chromosom entsteht eine Tochterzelle (D) mit 3 Kopien der Zielregion, und eine weitere Zelle (E) mit nur einer Kopie. Als Folge von Selektion wird der BFB-Zyklus mehrmals wiederholt, was eine weitere Vermehrung des Amplikons bewirkt.

Verschiedene Studien belegen zudem, daß eine Integration externer DNA bevorzugt an Stellen des Genoms stattfindet, an welchen CFSs induziert werden. Virale Genome, z.B. des humanen Papillomavirus (HPV), wurden in unterschiedlichen Tumortypen integriert in CFSs gefunden (Wilke *et al.*, 1996; Ferber *et al.*, 2003; Thorland *et al.*, 2003; Ragin *et al.*, 2004). In nichtmalignen Zellen bewirkte der Einfluß von APC eine stark signifikante Verschiebung des Einbaus fremder Sequenzen von einem mehr oder minder zufälligen Muster in unbehandelten Zellen hin zu einer selektiven Integration in das häufigste humane CFS FRA3B (Rassool *et al.*, 1991).

Aufgrund des gehäuftten Auftretens tumorbedingter zytogenetischer Aberrationen und viraler Integrationen in CFSs wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß CFSs chromosomale Regionen geringer Stabilität darstellen und „hot spots“ für genomische Umbauten bilden, welche im Prozeß der Tumorgenese und Tumorprogression bedeutsam sind (Richards, 2001; Popescu, 2003).

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, wonach Stellen häufiger Deletionsbruchpunkte in soliden Tumoren auf dem Chromosomenarm 3p mit evolutionär instabilen Segmenten übereinstimmen (Kok *et al.*, 1997; Kost-Alimova *et al.*, 2003). FRA3B liegt ebenfalls über einem deletierten Bereich, der jedoch keine der untersuchten Merkmale für evolutionäre Instabilität (intragenomische Duplikationen und Randstellen konservierter Regionen zwischen Mensch und Maus) aufweist (Huebner *et al.*, 1998; Kost-Alimova *et al.*, 2003).

1.3.2 CFSs in Säugetieren

Der Mechanismus zur Ausbildung von CFSs – bisher unbekannt – ist nicht auf den Menschen beschränkt. In den Zellen einer Vielzahl unterschiedlicher Säuger wurden CFSs bereits induziert. So zum Beispiel in Hunden (Stone *et al.*, 1991), Katzen (Ronne, 1995), Pferden (Ronne, 1992), Schweinen (Riggs *et al.*, 1993), Kühen (Rodriguez *et al.*, 2002), Ratten (Elder & Robinson, 1989), Wildmäusen (McAllister & Greenbaum, 1997) und Labormäusen (Sanz *et al.*, 1986). Untersuchungen der Konservierung von humanen CFSs wurden an den Chromosomen verschiedener Menschenaffenarten (Schimpanse, Gorilla und Orang Utan), sowie an Makaken und an Mäusen durchgeführt. In der ersten Studie wurden CFSs mittels Fluorodeoxyuridine (FdU) und Coffein in T-Lymphozyten aus peripherem Blut von zehn Menschen, einem Schimpansen und einem Gorilla induziert. 51 Menschen-, 53 Schimpansen- und 47 Gorilla-Chromosomenbanden wurden als CFS bezeichnet, definiert durch mindestens einmalige homozygote Expression in 200 analysierten Metaphasen. Von den 51 humanen CFSs wurden 50 bzw. 46 als konserviert in den homologen Bereichen der Affengenome beschrieben (Yunis & Soreng, 1984). Eine andere Arbeit induzierte T-Lymphozyten-CFSs mittels APC und zählte jene Banden als fragil, welche in 370 bis 517 untersuchten Metaphasen zweimal oder häufiger Lücken / Brüche exprimierend gefunden wurden. Auf diese Weise wurden 95 humane CFSs beschrieben, von denen 33, 46 und 66 in den homologen chromosomalen Bereichen von Orang-Utan-, Schimpanse- und Gorilla-CFSs lagen. Ein Vergleich der jeweils 11 häufigsten CFSs belegte eine Übereinstimmung von 5, 6 und 7 homologen Banden zwischen Mensch und den drei Affenarten (Smeets & van de Klundert, 1990). Ruiz-Herrera *et al.* behandelten T-Lymphozyten von *Macaca fascicularis* mit APC und zählten alle diejenigen Banden als CFS, welche in 1261 untersuchten Metaphasen mindestens drei Läsionen aufwiesen. Von den insgesamt 95 Makaken-CFSs kartieren 38 (40%) zu homologen Banden von 76 humanen CFSs, und 50% der humanen CFSs wurden einem *M. fascicularis*-Ortholog zugeteilt. Die Autoren beschrieben diese Übereinstimmung als signifikant. Die Zuordnung homologer Bereiche bzw. evolutionärer Bruchpunktregionen zwischen den beiden Genomen basierte auf einer Kombination aus ZOO-FISH (vergleichendes Chromosomen-Painting) und G-Bänderung. Von den 17 evolutionären Bruchpunktstellen stimmten neun mit CFS-Banden im Menschen und/oder *Macaca fascicularis* überein. Auch diese Übereinstimmung war signifikant (Ruiz-Herrera *et al.*, 2002). Synteniebruchregionen und CFSs wurden gemeinsam ebenfalls in anderen Studien betrachtet. Durch den Vergleich der G-Bänderung von Chromosomen dreier Primatenarten mit denen des Menschen wurden 47 Banden identifiziert, welche in evolutionäre Umbauten involviert waren. Davon exprimierten 30 ein CFS im Menschen und/oder in einer der Affenarten. Allerdings betraf dies nur wenige der häufig exprimierten CFSs (Smeets & van de Klundert, 1990). Carme *et al.* untersuchten schließlich Translokationen und Inversionen als Folge von APC, indem sie die humanen T-Lymphozyten vor ihrer Aufarbeitung einen weiteren Proliferationszyklus in APC-freiem Kulturmedium passieren ließen. 41 der insgesamt 104 Bruchpunkte traten in Chromosomenbanden auf, welche in T-Lymphozyten als CFSs beschrieben wurden (Denison *et al.*, 2003b). Von den 46 verschiedenen Banden der 104 Bruchpunkte stimmten nur sechs mit rearrangierten Stellen in der Primatenevolution (ermittelt durch den Vergleich G-gebänderter Chromosomen von *Cebus capucinus*, *Cercopithecus nictitans*, *C. nigroviridis*, *Gorilla gorilla*, *Lagothrix lagothericha*, *Pan paniscus*, *Pongo pygmaeus* = Orang-Utan und *Pan troglodytes* =

Schimpanse) überein (Carme *et al.*, 1999). Es ist daher bis heute weitgehend ungeklärt, ob CFSs bei der Evolution der Karyotypen eine Rolle gespielt haben.

Als vor 20 Jahren Korrelationsstudien von CFSs zwischen Mensch und Maus angefertigt wurden, war die Zuordnung homologer Banden extrem unsicher und fehlerbehaftet. So wurde zum Beispiel die das *Fhit*-Gen enthaltende homologe Mausregion zum häufigsten humanen CFS in der Bande 3p14 fälschlicherweise der humanen Region 10q zugeordnet (Djalali *et al.*, 1987). Eine andere Arbeit analysierte FdU-induzierte Läsionen in Fibroblasten zweier Mausstämme und beschrieb stammspezifische Muster der Expression von Lücken, Brüchen und Austausch. Um eine Bande als CFS zu bezeichnen, mußten zwei Bedingungen erfüllt sein: a) die mindestens zweimalige Expression einer Läsion in zwei von zwei bzw. drei Tieren eines Stammes und b) eine Involvierung in einen chromosomalen Umbau. Als Folge dieser Definition wurden sowohl gemeinsame als auch Stamm-spezifische CFSs beschrieben (Sanz *et al.*, 1986). Da Lymphozyten und Fibroblasten von Mäusen sich in ihrem CFS-Expressionsmuster unterscheiden (Elder & Robinson, 1989), ist ein direkter Vergleich der von Sanz *et al.* ermittelten CFSs in Fibroblasten mit Veröffentlichungen über CFSs in Lymphozyten anderer Mausstämme kritisch. Eine vergleichende Studie zwischen den eng verwandten Arten Maus und Ratte detektierte nur vier homologe CFS-exprimierende Banden, welche sich zusätzlich in ihren Expressionshäufigkeiten unterschieden. Allerdings wurden verschiedene Chemikalien zur Induktion verwendet (APC für die Maus; FdU, APC, FdU+APC für die Ratte). Als Bedingung für die Definition eines CFS galt in beiden Spezies eine signifikant erhöhte Brüchigkeit der Bande und zusätzlich für die Maus, aber nicht für die Ratte, eine homozygote Expression der Läsion. Den gravierendsten Schwachpunkt aber stellte die Zuordnung homologer Bereiche zwischen beiden Spezies dar. Beruhend auf dem Vergleich gebänderter Chromosomen beschreiben die Autoren acht Autosomen ohne Synteniebruch. An diesen wurde die Konservierung der CFSs untersucht (Elder & Robinson, 1989). Neuere Sequenzvergleiche belegen für fast alle der acht Chromosomen mindestens einen evolutionären Umbau zwischen Maus und Ratte. Die bisher zusammengefaßten rein zytogenetischen Analysen erzielten sehr unterschiedliche Ergebnisse und können somit nicht eindeutig belegen, inwiefern die Expression von CFSs über Artengrenzen hinaus konserviert ist.

Molekular-zytogenetisch vergleichende Untersuchungen wurden bisher nur an wenigen der am häufigsten beobachteten humanen CFSs vorgenommen. Eine Konservierung wurde für FRA3B und FRAXB in Zelllinien von Schimpanse, Orang-Utan, Bonobo und Pavian gezeigt. In der Zelllinie einer weiteren Primatenart, dem Gibbon, überspannten die Proben für FRAXB ebenfalls ein CFS; FRA3B wurde in diesen Zellen aber nicht exprimiert. Da die mRNA des Gibbon-FHIT-Orthologs detektiert werden konnte, ist auszuschließen, daß ein evolutionärer Bruch im Epizentrum von FRA3B diesen Unterschied verursacht (Loeb *et al.*, 2001).

FRA3B, FRA4F und FRA16D wurden in der Maus auf molekularer Ebene konserviert gefunden und entsprechen dort Fra14A2 (Glover *et al.*, 1998), Fra6C1 (Rozier *et al.*, 2004) und Fra8E1 (Krummel *et al.*, 2002). DNA-Sequenzvergleiche zwischen Maus und Mensch deckten hoch konservierte Regionen innerhalb beider CFSs auf, welche jedoch ebenso in kodierenden Bereichen nichtfragiler Kontrollregionen beobachtet wurden (Shiraishi *et al.*, 2001; Krummel *et al.*, 2002).

Bisher ungeklärt bleibt die Frage, inwiefern die Instabilität der CFSs zur Karyotypevolution beiträgt oder inwieweit CFSs über Artgrenzen hinaus konserviert sind und damit möglicherweise von essenzieller Bedeutung für das Überleben der Zellen sind.

1.3.3 Merkmale von CFSs

Anhand der bekannten Sequenzen der 12 bereits klonierten CFSs (siehe Kapitel 1.3.1) wurde nach gemeinsamen Eigenschaften gesucht, welche für die fragilen Regionen charakteristisch sind.

Repetitive Elemente

Im Gegensatz zu den Rare Fragile Sites wurden an den Stellen der Common Fragile Sites keine Trinukleotidrepeats detektiert und der molekulare Mechanismus ihrer Brüchigkeit ist bis heute ungeklärt. Untersuchungen über die Gesamtmenge repetitiver Elemente und den Anteil von Alu-Repeats, SINEs (short interspersed elements), LINEs (long interspersed elements), LTRs (long terminal repeat elements), MERs, MIRs und DNA-Elementen in Teilen von sechs humanen und zwei murinen CFSs ergaben Verteilungen, die mit Durchschnittswerten des gesamten humanen Genoms, sowie des Mausgenoms, bei entsprechendem GC-Gehalt, vergleichbar sind (Mishmar *et al.*, 1998; Ried *et al.*, 2000; Shiraishi *et al.*, 2001; Krummel *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2003).

DNA-Helix-Flexibilität

Jüngeren Veröffentlichungen zufolge zeichnen sich CFSs durch die Existenz von Bereichen mit erhöhter Flexibilität der DNA-Helix aus. Der Begriff Helix-Flexibilität beschreibt die Stärke potentieller Biegungen und Verwindungen des DNA-Moleküls. Sarai *et al.* zeigten auf, daß die konformative Flexibilität der DNA in starkem Maße von der Sequenz bestimmt wird (Sarai *et al.*, 1989). Die Autoren berechneten spezifische Flexibilitätswerte für jedes der möglichen Dinukleotide auf der Grundlage der konformativen freien Energien und bestätigten diese Werte durch Vergleiche mit experimentellen Ergebnissen. In jedem der neun bisher untersuchten menschlichen CFS-Sequenzen, sowie in zwei Maus CFS-Regionen wurden Inseln mit signifikant erhöhter potentieller DNA-Flexibilität, verglichen mit dem Durchschnitt der jeweils untersuchten Region, beschrieben. (siehe Tabelle 1.3) (Mishmar *et al.*, 1998; Ried *et al.*, 2000; Krummel *et al.*, 2002; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2003; Zlotorynski *et al.*, 2003). Allerdings fehlt bis zum heutigen Tag die Betrachtung einer ausreichenden Anzahl von Kontrollregionen, die keine CFSs enthalten. Die initiale Analyse von CFS-Flexibilitäten (Mishmar *et al.*, 1998) beinhaltete 14 sehr kleine Kontrollregionen mit einer Gesamtgröße von 1,1 Mb. Immerhin 17,2 Mb Kontrollsequenz wurden im Jahr 2003 von Zlotorynski *et al.* (Zlotorynski *et al.*, 2003) analysiert. Auch in dieser Arbeit setzte sich die Kontrolle aus kleineren Einzelbereichen von 0,85 bis 4,9 Mb zusammen, deren individuelle Flexibilitätswerte nicht angegeben wurden. Aus welchen Gründen speziell diese Teile ganzer Banden mit geringer CFS-Expression als Kontrollen gewählt wurden, blieb unerklärt. Obwohl beide Veröffentlichungen eine signifikant höhere Anzahl flexibler Inseln in den Regionen der CFSs beschreiben, ist somit bisher nicht zweifelsfrei geklärt, ob Stellen mit erhöhten Flexibilitätswerten auf Bereiche von CFSs beschränkt sind und damit ein echtes Charakteristikum dieser Strukturen darstellen. Der

Berechnung der Flexibilitätswerte eines Sequenzabschnittes liegt die Abfolge von Dinukleotiden zugrunde, wobei $(AT)_n$ den höchsten Einzelwert erzielt. Deshalb weisen Regionen mit besonders hoher Flexibilität eine große Zahl von AT-Dinukleotiden auf. Diese Abschnitte wären dann in einzelsträngiger DNA - zum Beispiel während der Replikation - möglicherweise in der Lage, haarnadelartige Sekundärstrukturen auszubilden, welche die Aktivität der Replikationsenzyme behindern würden (Handt *et al.*, 2000; Sinden, 2001; Morelli *et al.*, 2002; Zlotorynski *et al.*, 2003). Bisher ist jedoch nicht aufgezeigt worden, daß *in vivo* tatsächlich Haarnadelstrukturen in der hochmolekularen genomischen DNA entstehen. Und der als hoch beschriebene AT-Gehalt der CFS-Sequenzen (~60%) (Mishmar *et al.*, 1998; Shiraishi *et al.*, 2001; Morelli *et al.*, 2002; Limongi *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2003; Zlotorynski *et al.*, 2003) wird ebenso in stabilen Kontrollregionen gefunden (Shiraishi *et al.*, 2001), denn entsprechende Basenverteilungen sind insbesondere in G-Banden häufig anzutreffen (UCSC-Browser). Eine rein auf der Sequenzabfolge beruhende Ursache für die Ausbildung von CFSs ist eher unwahrscheinlich, da das Muster der CFSs zwischen verschiedenen Geweben variiert (siehe unten).

Replikationszeitpunkt

Die Substanzen, mit denen CFSs bei phänotypisch normalen Probanden induziert werden, beeinträchtigen die Replikation der DNA. Bromodeoxyuridine (BrdU) und Fluorodeoxyuridine (FdU) wirken durch eine Konkurrenz mit dTTP als Inhibitoren der DNA-Synthese. 5-Azacytidine bewirkt neben der Inhibierung der DNA-Methyltransferase, Induktion von Histonhyperacetylierung und Dekondensierung von Heterochromatin auch eine Hemmung der Replikation durch Substitution von dCTP (Kang *et al.*, 2000; Takebayashi *et al.*, 2001). Aphidicolin (APC) inhibiert die Polymerasen α (Sheaff *et al.*, 1991), δ (Byrnes, 1984) und ϵ (Cheng & Kuchta, 1993). Alle drei Polymerasen sind an der Replikation der Kern-DNA sowie an verschiedenen Reparaturmechanismen beteiligt.

Die Inhibierung der DNA-Replikation durch APC beruht auf der Bildung eines ternären Komplexes mit der Polymerase und der DNA (Sheaff *et al.*, 1991). Im Ergebnis entstehen lichtmikroskopisch sichtbare Chromatidlücken und Brüche in der DNA (Carme *et al.*, 1999; Rothkamm *et al.*, 2003). In Anwesenheit von APC steigt die p53-Konzentration an (Michael & Rajewsky, 2001). Zellen, welche sich in der S-Phase befinden, können nicht mit der DNA-Synthese fortfahren und arretieren in S. Zellen in anderen Phasen des Zellzyklus stoppen an der G₁/S-Grenze (Pedrali-Noy *et al.*, 1981; Sheaff *et al.*, 1991). Da das Auftreten von Chromatidlücken und Brüchen aber in Metaphasechromosomen beobachtet wird, beziehen sich alle CFS-Daten auf Zellen, die den Zellzyklus trotz entstandener Replikationsverzögerungen oder -schäden fortsetzen konnten.

Untersuchungen zum Replikationszeitpunkt während der S-Phase wurden an mehreren CFSs mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt. Der Einbau von BrdU in die DNA ermöglichte dabei jeweils das Erkennen der replizierten DNA in S-Phase-Zellen. Le Beau *et al.* untersuchten die Replikationszeiten der FRA3B-Allele mittels Interphase-FISH-Analysen in BrdU-positiven Zellkernen. Unreplizierte Regionen waren als einzelne Signale, replizierte Bereiche als Doppelpunkte zu sehen. Die Häufigkeit von Doppelsignalen dreier DNA-Sonden aus dem Epizentrum von FRA3B entsprach den Ergebnissen der spätereplizierenden Kontrolle (Le Beau *et al.*, 1998). Wang *et al.*

begrenzten den Einbau von BrdU auf die letzten 3h vor Aufarbeitung der Zellen, um speziell Stellen später Replikation an Metaphasechromosomen zu erkennen. Die beiden Chromosomen 3 wiesen in der verwendeten Zelllinie strukturelle Besonderheiten auf, so daß diese unterscheidbar waren. BrdU-positive Signale für späte Replikation traten sowohl in APC-behandelten als auch in unbehandelten Zellen signifikant häufiger in einem der beiden FRA3B-Allele auf. Die Expression des CFSs wurde dann auch bevorzugt in dem BrdU-positiven Chromosomenabschnitt und damit in dem spät replizierenden Allel beobachtet. Diese Ergebnisse wurden mit einer zweiten Methode überprüft: mittels Flow-Zytometrie wurden die Zellen entsprechend ihres Zellzyklusstatus aufgetrennt und die BrdU-markierte DNA aus den verschiedenen Fraktionen der S-Phase isoliert. Die PCR-Amplifikation von *FHIT*-Exons und von Kontrollregionen mit bekannten Replikationszeiten belegte eine klar asynchrone Replikation von *FHIT*, wie sie innerhalb der Kontrollen nur für gametisch geprägte Regionen gesehen wurde. Die Zugabe von APC führte zu einer weiteren Verzögerung der Replikationszeit von FRA3B, wobei diese für die beiden Allele asynchron blieb (Wang *et al.*, 1999). Palakodeti *et al.* untersuchten die FRA16D-Region (Palakodeti *et al.*, 2004). Wie in der oben zitierten Studie, wurden BrdU-markierte DNA aus unterschiedlichen Fraktionen der S-Phase gewonnen und Ziel- sowie Kontrollsequenzen bekannter Replikationszeiten mittels PCR-amplifiziert. Die Autoren beschrieben für die gesamte Länge von FRA16D eine späte, aber synchrone Replikation. APC hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Replikationszeiten der FRA16D-Sequenzen. Weiterhin zeichnen sich DNA-Abschnitte aus FRA7G (1 Mb, Hellman *et al.*, 2002) und FRA7H (160 kb, Hellman *et al.*, 2000) durch eine asynchrone, aber frühe bzw. mittlere Replikation aus, wie Interphase-FISH Experimente an BrdU-positiven Kernen belegten. Die hierfür analysierten Sequenzabschnitte unterschieden sich allerdings von denen in FRA3B und FRA16D durch ihre relativ geringe Fragilität, da nicht die Epizentren der CFSs untersucht wurden (FISH-Ergebnisse in Mishmar *et al.*, 1998 und Hellman *et al.*, 2002). Die Untersuchungen an FRA3B und FRA16D lassen vermuten, daß eine späte Replikation möglicherweise ein Charakteristikum der häufig exprimierten CFSs darstellt.

DNA-Reparatur und Checkpoint-Kontrolle

Mehrere Arbeiten zeigten, daß Zellen mit Defekten in DNA-Reparaturmechanismen eine erhöhte Expression von CFSs aufweisen. Eine lymphoblastoide Zelllinie, gewonnen von einem Patienten mit einer *PMS2*-Keimbahnmutation, exprimierte nach Induktion durch APC und Coffein eine signifikant größere Anzahl an CFSs pro Zelle als eine Kontrolle ohne Schäden in Reparaturmechanismen (Turner *et al.*, 2002). Untersuchungen an *Msh2*^{-/-}, *Mlh1*^{-/-}, *Fhit*^{-/-}, *p53*^{-/-}, und *Brca1*^{-/-} Zelllinien der Maus ergaben eine signifikant erhöhte Expression von CFSs bei Funktionsverlust der Proteine Msh2, Mlh1, Fhit bzw. Brca1, nicht aber bei Verlust der p53-Funktion. Die Studie legte somit deutlich klar, daß Proteine der Mismatch- und DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen für die Integrität der CFS-Regionen bedeutsam sind. Arlt *et al.* beschrieben in einer humanen Brustkrebszelllinie mit fehlender BRCA1-Funktion eine erhöhte CFS-Expression aufgrund der fehlenden Kontrolle des G₂/M-Zellzyklus-Checkpoints, welche durch Transfektion mit Wildtyp-*BRCA1* signifikant verringert wurde (Arlt *et al.*, 2004). Casper *et al.* erkannten, daß der Verlust der ATR-Funktion unter dem Einfluß von APC, aber auch spontan zu einer erhöhten CFS-Rate führt (Casper *et al.*, 2002). Besonders interessant ist, daß auch die oben erwähnten Reparaturproteine Msh2, Mlh1, Fhit und Brca1 über ATR-regulierte

Signalwege als Zellzyklus-Checkpoint-Regulatoren fungieren (Simpkins *et al.*, 1999; Cortellino *et al.*, 2003; Foray *et al.*, 2003; Wang & Qin, 2003; Hu *et al.*, 2004; Arlt *et al.*, 2004).

Ein Modell für den zellulären Mechanismus der CFS-Expression wurde von Casper *et al.* beschrieben (siehe Abbildung 1.3.2). Danach sind exprimierte CFSs einzelsträngige, unreplizierte DNA-Abschnitte, welche durch einen Stillstand der Replikationsgabel verursacht wurden. Der Grund für die erhöhte Sensitivität der CFS-Regionen gegenüber einer Verzögerung oder einem Block der DNA-Synthese ist dabei unbekannt. Die Replikationsschäden bewirken an S- und/oder G₂/M-Checkpoints einen Zellzyklusarrest – der Prozeß ist ATR-abhängig – und die Reparatur der DNA-Schäden. Zellen, welche die Zellzyklus-Checkpoints unterlaufen, exprimieren sichtbare Chromatidlücken in den Metaphasechromosomen, möglicherweise als Folge mangelnder Kondensierung der einzelsträngigen DNA. Deletionen entstehen durch DNA-Doppelstrangbrüche und Translokationen durch illegitime Rekombination während der Reparatur (Casper *et al.*, 2002).

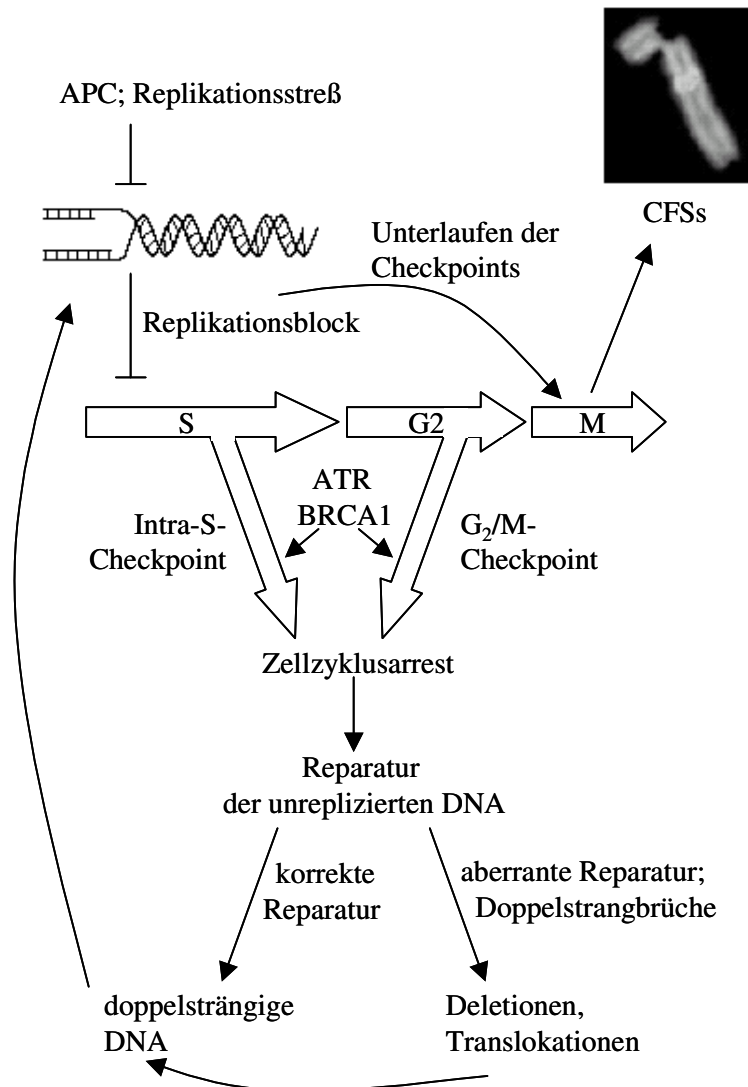


Abbildung 1.3.2 Modell der CFS-Expression, modifiziert nach Casper *et al.*, 2002.

Gewebsspezifische CFS-Expressionsmuster

Die Expression der CFSs variiert zwischen verschiedenen Zelltypen. Gewebsspezifische CFS-Muster wurden für T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Hautfibroblasten, Amnionzellen und Knochenmarkzellen beschrieben (Morgan *et al.*, 1988; Murano *et al.*, 1989a; Murano *et al.*, 1989b; Simonic & Gericke, 1996). Innerhalb der fünf Zelltypen ähneln sich besonders B- und T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer CFS-Expression. Die drei am häufigsten CFS-exprimierenden Chromosomenbanden in T-Lymphozyten sind 3p14, 16q23 und Xp22.2. 16q23 zählt in allen fünf untersuchten Zelltypen zu den fünf häufigsten APC-induzierten CFSs. 3p14 bildet mit über 10% aller Lücken/Brüche eine der drei häufigsten CFSs in vier verschiedenen Geweben, in Fibroblasten dagegen steht es mit weniger als 3% nur an achter Stelle. Xp22.2, eine der fünf fragilsten Banden in B- und T-Lymphozyten, wurde in Fibroblasten, Amnion- oder Knochenmarkzellen nicht beschrieben. Weitere gewebsspezifische CFSs sind 3q26.2 in Fibroblasten (23,6%), 4q23 im Knochenmark (12,3%) und in B-Lymphozyten (4,9%), 1p31 in Amniozyten (14,9%) und in Fibroblasten (6,0%).

Es ist aufgrund dieser Beobachtungen wahrscheinlich, daß die Faktoren, welche die Expression eines CFSs durch die Ausbildung der Chromatinlücken und Brüche bewirken, nicht in der DNA-Sequenz *per se* zu suchen sind.

Trotz der zahlreichen Untersuchungen und Ergebnisse bleibt bis heute ungeklärt, über welche Mechanismen speziell an den CFSs Chromatinlücken und Brüche entstehen.

1.4 Methodische Grundlagen der eingesetzten molekular-zytogenetischen Analysen

1.4.1 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Das Prinzip der *In-situ*-Hybridisierung beruht darauf, daß zwei komplementäre einzelsträngige DNA-Sequenzen die Fähigkeit besitzen, sich aneinander zu lagern und dabei einen DNA-Doppelstrang (Hybrid) bilden. Spezifische DNA-Sequenzen (Sonden) werden z.B. in einer PCR-Reaktion mit Reportermolekülen markiert und durch ihre anschließende Hybridisierung auf einem Target lokalisiert. Das DNA-Target liegt im Interphasezellkern oder Metaphasechromosom durch Histon- und Nichthiston-Proteine in einer hochkondensierten Form verpackt vor.

Die *In-situ*-Hybridisierungsmethode wurde in den 60er Jahren entwickelt. Damals verwendete man als Sonden radioaktiv markierte DNA und RNA (Pardue & Gall, 1969). Anfang der 80er Jahre wurden Nukleinsäuren erstmals enzymatisch mit Haptenen (kleinen Molekülen) markiert, die mit Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden konnten (Langer *et al.*, 1981). Die Verwendung von Fluorochromen hatte mehrere Vorteile gegenüber der herkömmlichen radioaktiven Markierung. Die Sonden waren wesentlich stabiler und man erreichte eine höhere räumliche Auflösung. Zudem ersetzte die Auswertung der Präparate direkt am Mikroskop die zeitaufwendige Autoradiographie. Es entstand kein radioaktiver

Abfall mehr. Ein weiterer wesentlicher Vorteil fluoreszierender Proben bestand in der Möglichkeit, mehrere verschiedene Sonden gleichzeitig hybridisieren und unterscheiden zu können.

Als Sonden dienen z.B. BACs (Bacterial artificial chromosomes) und chromosomenspezifische Sonden, die durch hochauflösende Zwei-Farben-Durchflußzytometrie (Vooijs *et al.*, 1993; Ferguson-Smith, 1997) oder durch Mikrodissektion (Guan *et al.*, 1994) gewonnen wurden. Sowohl die Target- als auch die Sonden-DNA müssen zunächst denaturiert (einzelnsträngig gemacht) werden, um dann miteinander zu hybridisieren. Die für DNA-Sonden verwendete genomische DNA enthält zwischengelagerte repetitive DNA-Sequenzen (z.B. Alu-Repeats), die mit ähnlichen Sequenzen der Target-DNA hybridisieren. Dies erzeugt eine unspezifische Hybridisierung, die das auf Einzel-Kopie-Sequenzen beruhende Hybridisierungssignal überdecken kann. Deshalb ist es hilfreich, markierte repetitive DNA-Sequenzen vor der Hybridisierung auf das Target mittels C₀t-1-DNA möglichst vollständig in der Sonde zu blockieren (Pinkel *et al.*, 1988). Die Abkürzung C₀t bedeutet: Konzentration [Mole Nukleotide/Liter] x Zeit [Sekunden]. Zur Herstellung von C₀t-1-DNA wird genomische DNA in Fragmente von ca. 400 bp zerlegt, denaturiert und anschließend unvollkommen rehybridisiert. Säugetier-DNA zeigt drei verschiedene Komponenten in ihrem Reassoziationsverhalten: eine schnelle, eine intermediäre und eine langsame. Die schnelle Komponente entspricht hochrepetitiver DNA, die ca. 10% des *Mus musculus* Genoms betrifft. Die nach Abbruch der Reassoziations einzelsträngig verbleibende (vorwiegend nicht repetitive) DNA wird durch eine Nuklease verdaut. Somit gewinnt man repetitive C₀t-1-DNA zur Suppressionshybridisierung. Die repetitiven Fraktionen einer genomischen Sonde hybridisieren sehr schnell mit der im Überschuß zugegebenen C₀t-1-DNA, bevor das DNA-Gemisch mit dem Target in Kontakt kommt. Während der nachfolgenden Hybridisierung finden die einzelsträngigen Einzel-Kopie-Sequenzen ihre Zielsequenz. Nach der Hybridisierung werden überschüssige DNA-Sequenzen durch Waschschritte entfernt. Nicht fluoreszierende Haptenmoleküle werden anschließend detektiert. Dafür werden zunächst unspezifische Bindungsstellen im Target mittels Serum-Albumin abgedeckt. Fluoreszenz-markierte Moleküle wie z.B. Antikörper binden dann selektiv. Spezifische Signale werden danach bei gelungener Hybridisierung ausschließlich an den Orten der DNA-Sequenzübereinstimmung sichtbar.

Durch die Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben und den Einsatz entsprechender Filterkombinationen im Mikroskop lassen sich die unterschiedlich gefärbten Sonden aufgrund ihrer verschiedenen spektralen Eigenschaften einzeln betrachten und digital aufnehmen. Mittels computerunterstützter FISH-Systeme werden Graustufenbilder von den Emissionen einzelner Fluoreszenzfarben aufgenommen. Eine anschließende Überlagerung der Bilder ermöglicht ein Falschfarbenbild zur leichteren Auswertung der Ergebnisse. Mit herkömmlichen Filtersystemen können bis zu acht Farben diskriminiert werden.

In den letzten dreizehn Jahren haben fortschreitende technische Entwicklungen die Anwendungen der FISH-Analyse grundlegend erweitert. Im folgenden wird auf zwei Methoden näher eingegangen.

1.4.2 Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Ein lang angestrebtes Ziel in der Chromosomenforschung war es, alle Chromosomen in verschiedenen Farben darzustellen. Im Jahr 1996 gelang dies Schrock *et al.* mit der Entwicklung der SKY-Technik (Spectral Karyotyping) (Liyanage *et al.*, 1996; Schrock *et al.*, 1996) und Speicher *et al.* mit M-FISH (Speicher *et al.*, 1996). Da wir für unsere Untersuchungen die SKY-Technik verwendeten, wird diese im folgenden näher beschrieben. Die Methode erlaubt beispielsweise die Analyse stark rearrangierter Tumorkaryotypen und eine verbesserte Diagnostik von konstitutionellen Chromosomenaberrationen (Schrock *et al.*, 1997). Mittels der SKY-Technik werden speziell strukturelle Chromosomenaberrationen wie Translokationen und andere interchromosomale Aberrationen detektiert. Durch kombinatorische Markierung von Sonden mit fünf bis sieben Farbstoffen werden z.B. alle 24 menschlichen Chromosomen differentiell gefärbt dargestellt. Fünf Fluoreszenzfarben reichen aus, um 24 verschiedene Farbkombinationen herzustellen. Insgesamt sind $2^5 - 1 = 31$ unterschiedliche Kombinationen möglich. Dazu werden drei Fluorochrome und zwei Haptene an dUTP-gekoppelt in einer PCR-Reaktion in die Sonden-DNA eingebaut. Die Hybridisierung auf die zu untersuchenden Metaphasechromosomen erfolgt nach einem herkömmlichen FISH-Protokoll mit Suppression der repetitiven Sequenzen durch Kohybridisierung von C₀t-1-DNA. Die beiden Haptene werden im Anschluß spezifisch detektiert. Zur Spektralen Analyse der Fluoreszenzemissionen wird das interferometrische Prinzip genutzt. Die gesamte Fluoreszenz des mikroskopischen Objekts wird mittels eines Sagnac-Interferometers aufgenommen, das an eine hochauflösende CCD-Kamera gekoppelt ist. Das aufgezeichnete Interferogramm jedes Bildpunktes (Pixel) wird mit Fouriertransformation analysiert. Ausgehend von den ermittelten Spektren wird ein Falschfarbenbild hergestellt, das den spektralen Verteilungen des Originalbildes entspricht.

Der SpectraCube

Zur computergesteuerten Aufnahme spektraler Bilder in der SKY-Analyse wird als optisches Bauteil ein Spektrometer verwendet. In Abbildung 1.4.1 ist der Strahlengang im SpectraCube schematisch dargestellt. Das Fluoreszenzlicht der Probe gelangt über eine Sammellinse (Mikroskop) zum optischen Kopf. Dort trifft das Licht auf ein Sagnac-Interferometer, das vereinfacht aus zwei Spiegeln und einem Strahlenteiler besteht. Das einfallende Licht wird am Strahlenteiler in zwei Strahlen aufgeteilt, die beide den gleichen Weg über zwei Spiegel aber in verschiedene Richtungen zurücklegen und sich am Strahlenteiler wieder überlagern. Dabei kommt es in Abhängigkeit von der Differenz der optischen Weglänge (Gangunterschied) zu Interferenzen. Der Gangunterschied wird durch Rotation des Strahlenteilers bzw. durch Änderung des Winkels des einfallenden Lichts auf den Strahlenteiler verändert. Das Interferogramm, die resultierende Interferenzintensität als Funktion des Gangunterschieds, wird für jedes Bildpixel aufgenommen. Die einzelnen Kamerabilder der Intensitäten bei verschiedenen Gangunterschieden werden zum sogenannten Cube (Würfel, da abhängig von drei Koordinaten: x,y-Ortskoordinaten und λ -Wellenlänge) zusammengesetzt. Durch Fouriertransformation wird aus dem Interferogramm, der Überlagerungsfunktion identischer Spektren, die um einen Gangunterschied verschoben sind, das emittierte Spektrum ermittelt.

Zur Wiedergabe der Information des aufgenommenen Objekts am Bildschirm wird das Spektrum in drei Bereiche aufgetrennt, die jeweils in einer anderen Farbe (blau, grün, rot, RGB) dargestellt werden. Die Intensität der Farbe an jedem Bildpunkt ist proportional zur integrierten Intensität des entsprechenden spektralen Bereiches.

Zur Software des SKY-Systems gehört die Ähnlichkeitsanalyse, mit der Spektren der aufgenommenen Bilder mit Referenzspektren verglichen werden (siehe Garini *et al.*, 1999). Dazu wird der minimale quadratische Fehler $S_{x,y,n} = \sum [I_{x,y}(\lambda) - I_n(\lambda)]^2$ für jedes Pixel errechnet. Dabei ist $I_{x,y}(\lambda)$ das normalisierte Spektrum an den Pixelkoordinaten x,y . $I_n(\lambda)$ repräsentiert das normalisierte Referenzspektrum für jedes Chromosom $n = 1,2, \dots, 23(X), 24(Y)$. Nach Feststellung von $S_{x,y,n}$ für alle Referenzspektren wird der kleinste Wert für S gewählt und die Klassifikation durchgeführt, indem jedes Pixel dem ähnlichsten Referenzspektrum zugeordnet wird. Die Klassifikation wird durch Klassifikationsfarben (Falschfarben) neben dem RGB auf dem Chromosomenbild verdeutlicht.

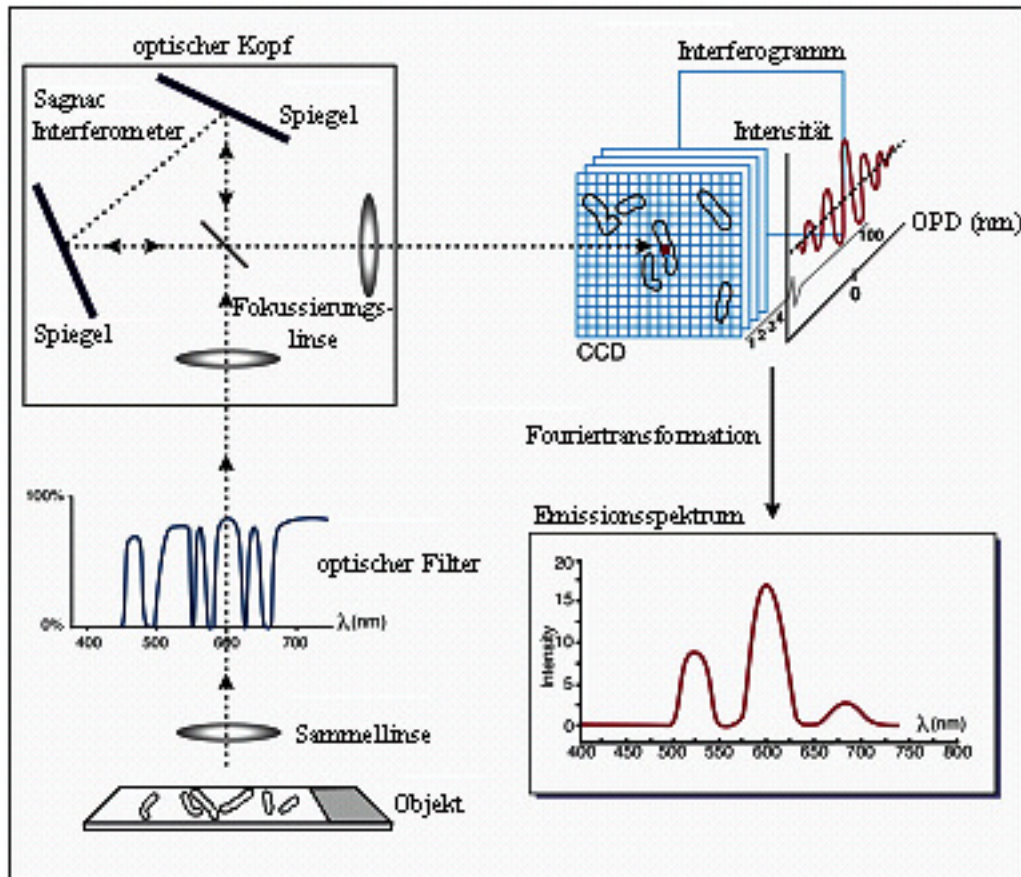


Abbildung 1.4.1 Schematische Darstellung des SpectraCubes, adaptiert nach (Schrock *et al.*, 1996).

1.4.3 Chromosomale CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (CGH) können genetische Ungleichheiten zwischen zwei Vergleichs-DNAs (Amplifikationen, Duplikationen oder Deletionen) festgestellt werden, ohne daß eine Chromosomenpräparation des zu untersuchenden „Test“- (Tumor- oder Patienten-) Genoms notwendig ist (Kallioniemi *et al.*, 1992; du Manoir *et al.*, 1993). Die Patienten-DNA und eine Kontroll-DNA werden mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, beispielsweise die Patienten-DNA mit einem grünen und die Kontroll-DNA mit einem roten Farbstoff. Beide Sonden werden gleichzeitig auf normale Metaphasen hybridisiert. Bei der computergestützten Bildanalyse eines CGH-Experimentes (du Manoir *et al.*, 1995; Piper *et al.*, 1995) wird zunächst eine automatisierte Segmentierung der Chromosomen vorgenommen. Anschließend werden die Hybridisierungsintensitäten der unterschiedlich markierten Sonden normalisiert. Die absolute Intensität wird durch viele variierende Parameter beeinflusst und trägt deshalb keine essentielle Information. Durch bestimmte Normierungsfaktoren wird ein medianes Intensitätsverhältnis von 1 erreicht. Des Weiteren wird der lokale Hintergrund korrigiert, da in einem Hybridisierungsexperiment der fluoreszierende Hintergrund über eine gesamte Metaphase variieren kann. Danach werden die Intensitätsprofile der Kontroll- und Testhybridisierung bestimmt, indem für beide Fluoreszenzen die Pixelwerte der einzelnen Schnitte, die senkrecht zur Chromosomenachse stehen, gemittelt werden. Daraus lassen sich die Intensitätsverhältnisse für die Test- und Kontroll-DNA an jedem Chromosomensegment bestimmen. Ist die Kopienzahl einer DNA-Sequenz in Patienten- und Kontrollsonde identisch, so zeigt die Hybridisierung auf den Chromosomen an der entsprechenden Stelle ein ausgeglichenes Intensitätsverhältnis beider Fluoreszenzfarbstoffe, was im Mikroskopbild als gelbe Mischfarbe zu erkennen ist. Liegt eine Deletion oder Amplifikation beim Patienten vor, so zeigt sich dies in einer Unter- oder Überrepräsentation der patientenspezifischen Hybridisierung. Der betroffene Bereich wird auf dem Chromosomenpräparat bei einer Amplifikation als mehr grünes und bei einer Deletion als mehr rotes Signal sichtbar.

Innerhalb der letzten Jahre wurden intensive Bemühungen durchgeführt, um die Anwendung der CGH-Technik entscheidend zu verbessern. Angestrebt wurde dabei eine höhere Auflösung und die Unabhängigkeit von Zellkultur und Metaphasepräparation, um mit einem geringerem Zeitaufwand Ergebnisse in automatisierter Form zu erzielen. Im Jahr 1997 etablierten Pinkel *et al.* den Matrix-basierten CGH-Array (Matrix-CGH) (Pinkel *et al.*, 1998). Bei dieser Methode werden die Metaphasechromosomen durch klonierte DNA-Proben, aufgebracht auf eine Glasoberfläche, ersetzt. Dadurch wurde eine automatisierte Analyse und die Detektion von chromosomalen Ungleichgewichten mit höherer Auflösung, wie den Zugewinn kurzer Sequenzbereiche oder Mikrodeletionen, ermöglicht.

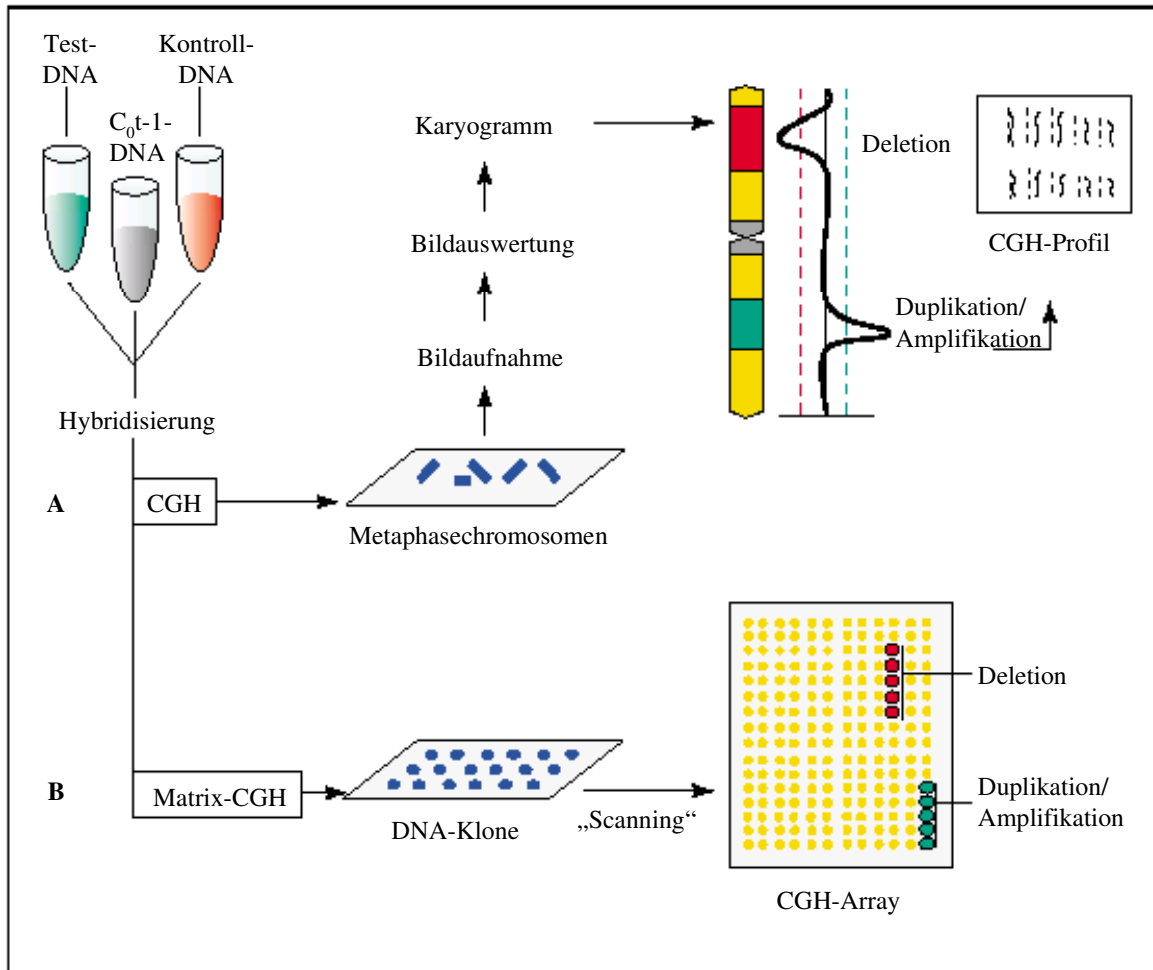


Abbildung 1.4.2 Schema der CGH und Matrix-CGH, übernommen aus Tonnies, 2002. Die Patienten- und Kontroll-DNAs werden mit grünem bzw. rotem Fluoreszenzfarbstoff markiert. **(A)** Für eine chromosomale CGH-Analyse werden die Sonden auf normale Metaphasen hybridisiert. Nach der Bildaufnahme und -auswertung wird ein Karyogramm erstellt, in dem das Profil der chromosomalen Ungleichgewichte sichtbar ist. **(B)** Bei der Matrix- oder Array-CGH hybridisieren die Proben auf spezifische DNA-Klone, welche das gesamte Genom oder Teile daraus repräsentieren. Die resultierenden relativen Fluoreszenzintensitäten werden durch Laser-„Scanning“ detektiert und mit Hilfe komplexer Software am Computer ausgewertet. Mit beiden Methoden zeigen sich numerische Unterschiede zwischen den untersuchten Genomen als eine Über- oder Unterrepräsentation der grünen Fluoreszenz auf den betroffenen Chromosomenbereichen bzw. DNA-Klonen. Deletionen im Patientenmaterial sind als mehr rotes, Amplifikationen als mehr grünes Fluoreszenzsignal zu erkennen.

2 Zielstellung

CFSs sind chromosomale Regionen, die in Zellen mit replikativem Streß als Chromatidlücken, Chromosomenbrüche und Translokationsbruchpunkte in Erscheinung treten. Ihre Eingebundenheit bei der Entstehung von Deletionen, Amplifikationen und Translokationen während der Tumorgenese wird diskutiert.

Ein Ziel der Arbeit war es, mittels genomweiter molekular-zytogenetischer Methoden die Lymphome des *Eμ-myc / INK4a/ARF*+/- bzw. *Eμ-myc / ARF*+/- Mausmodells zu charakterisieren. Aufgrund der Erkenntnisse an menschlichen Lymphomen erwarteten wir, Chromosomentranslokationen in den Tumoren des Mausmodells zu finden. So sollte geprüft werden, ob rekurrente Translokationsbruchpunkte in den Regionen von CFSs auftreten. Zusätzlich würden auch neue Kenntnisse über die Wirkungsweisen der beiden Tumorsuppressoren INK4a und ARF bei der Tumorentstehung gewonnen werden. Darüberhinaus wollten wir nach genetischen Markern für eine therapierelevante Subklassifizierung *INK4a/ARF*-defizienter Tumore suchen.

Unser zweites Ziel war es zu prüfen, inwieweit CFSs evolutionär konservierte Strukturen darstellen. Die CFS-Expression sollte in Lymphozyten zweier Labor-Mausstämme zytogenetisch kartiert werden, um die Ergebnisse dann sowohl zwischen den beiden nah verwandten Mausstämmen, als auch in syntenischen Regionen zwischen Maus und Mensch zu vergleichen. Zudem wollten wir an ausgewählten Beispielen die Konservierung von CFSs auf molekular-zytogenetischer Ebene untersuchen.

Da der zelluläre Mechanismus der CFS-Expression noch weitgehend unbekannt ist, sollten im Anschluß die bekannten CFS-Sequenzen und die stabiler Kontrollregionen Untersuchungen über die molekularen Ursachen der CFSs erlauben. Insbesondere wollten wir analysieren, ob, wie derzeit vielfach angenommen, eine erhöhte DNA-Helix-Flexibilität ein spezifisches Merkmal von CFSs darstellt. Ebenso interessierte uns, ob eine spezielle Genstruktur und eine aktive Transkription mit der Ausbildung von CFSs einhergehen.

3 Material und Methoden

3.1 Chromosomenpräparation

Zur Analyse der CFSs und als Basis für die CGH-Experimente wurden Metaphasen aus Mauslymphozyten benötigt. Für die Chromosomenpräparation wurden Mäusen der Stämme C57BL/6 und BALB/c die Milz entnommen. Diese wurde sofort in 5 ml RPMI-Medium 1640 (Gibco BRL) plus Antibiotika (Penicillin / Streptomycin; Gibco BRL) überführt. Unter Verwendung eines sterilen Homogenisators wurden die Milzzellen aus dem Gewebeverband herausgelöst und anschließend in vier Zellkulturflaschen mit je 40 ml RPMI-Medium 1640 aufgeteilt. Das Medium enthielt zusätzlich 50 U/ml / 50 µg/ml Penicillin / Streptomycin, 20% Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (Gibco BRL), 60 µl 0.5%iges β -Mercaptoethanol, 50 µl Lipopolysaccharid (2,5 mg/ml; Sigma) zur Wachstumsförderung der B-Lymphozyten, und 60 µl Concanavalin A (5 µg/µl; Sigma) zur Induktion der T-Lymphozyten. Die Lymphozyten wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für eine Induktion von CFSs wurden die Flaschen für die letzten 24 h Kultur mit 0,2 µM und 0,4 µM Aphidicolin (Sigma) versetzt. Durch die Zugabe von 250 µl Colcemid (10 µg/ml; Gibco BRL) für einen Zeitraum von 15 Minuten wurden die Zellen in der Mitosephase des Zellzyklus arretiert, anschließend durch einen 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm pellettiert, vom Medium getrennt und in 37°C warmer 0,4%iger KCl-Lösung für 20 min hypotonisch behandelt. Der erneuten Pellettierung der Zellen bei 1.000 rpm folgten sechs Fixierungen mit Methanol / Eisessig, 3:1, bevor die Zellsuspension auf saubere Objektträger aufgetropft wurde. Für eine Lagerung der Präparate bei -80°C wurden die Metaphasen zuvor in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) dehydriert.

Lymphommetaphasen zur Analyse chromosomaler Aberrationen *INK4a/ARF*-defekter Tumoren wurden von Dr. Clemens Schmitt nach dem gleichen Protokoll (ohne Inkubation mit Aphidicolin) gewonnen. Wir erhielten das Material bereits in Form einer Zellsuspension in Methanol / Eisessig zur Präparation der Objektträger.

3.2 Herstellung der Sonden

Als Sonde bezeichnet man eine spezifische DNA-Sequenz oder ein Gemisch von Sequenzen, das an die komplementäre Sequenz eines stationären Targets hybridisiert. Sonden in FISH-Experimenten sind u.a. fluoreszierend markierte BACs oder chromosomenspezifische DNA-Bibliotheken. Die Hybridisierungstargets können Metaphasechromosomen oder Interphasezellkerne etc. sein.

3.2.1 Gewinnung genomischer DNA

Normale genomische Maus-DNA wurde als Kontrolle in CGH-Experimenten eingesetzt. Organe wie Herz, Leber und Nieren wurden mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und in 10 ml DNA-Puffer (0,2 M Tris pH 8,0; 0,1 M EDTA) aufgenommen. 500 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 1,2 ml 10% SDS wurden dem Puffer zugegeben, dann erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 45°C. Enthielt die Lösung am folgenden Morgen noch Gewebestücken, so wurde sie erneut mit Proteinase K versetzt. Bei einer klaren Lösung wurde die DNA nun durch Phasentrennung von Zelltrümmern aufgereinigt. Dafür schloß sich zwei Extraktionsschritten mit jeweils einem Volumen Phenol ein weiterer Schritt mit einem Volumen eines Chlorophorm-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) an. Dazwischen wurde jeweils für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert und die obere, wäßrige Phase, unter Vermeidung der Interphase, in ein neues Gefäß überführt. Auf diese Weise wurden Verschmutzungen, zumeist handelte es sich dabei um Proteine, denaturiert und sammelten sich in der organischen Phase beziehungsweise an der Grenzschicht zwischen den Phasen an, während die Nukleinsäuren in der wäßrigen Phase blieben. Die DNA wurde anschließend mit 125 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 25 ml Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, für 30 min bei 4°C pelletiert, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 5ml sterilem Wasser aufgenommen. Über Nacht löste sich die DNA unter Schütteln und wurde am nächsten Morgen mit 50 µl RNase (20 mg/ml) behandelt. Der RNA-Verdau fand für 1-4 h bei 37°C statt. Ihm folgte eine erneute Phenol- und Phenol / Chlorophorm-Isolierung sowie die Ethanolfällung und das Lösen der DNA in 1 x TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 1 mM EDTA). Ein Teil der gewonnenen DNA wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um den Erfolg der Präparation zu prüfen und die DNA auf eventuell verbliebene RNA-Kontaminationen zu testen. Außerdem wurde die DNA-Konzentration mit einem UV-Spektrophotometer bestimmt.

Die als Gegenstück der Kontroll-DNA in den CGH-Experimenten verwendete genomische DNA der Mauslymphome wurde von Dr. Clemens Schmitt ebenfalls nach einem Standardprotokoll gewonnen und uns in fertiger Form gelöst in 1 x TE übergeben.

3.2.2 Gewinnung der BAC-DNA

Maus-BACs und menschliche BACs wurden aufgrund ihrer angegebenen chromosomalen Positionen unter <http://genome.ucsc.edu> ausgewählt und beim RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) bestellt. Aus den gelieferten Escherichia coli-Stichkulturen wurden durch Ausstriche auf LB-Agar mit den Endkonzentrationen von 10 µg/ml Kanamycin bzw. 12,5 µg/ml Chloramphenicol und Übernacht-Kultur bei 37°C Einzelkolonien gezüchtet. Um die gelieferten Kulturen auf eine eventuelle Kontamination zu prüfen, wurde mit Hilfe des Mini-Präparationsprotokolls die DNA von drei Klonen pro Kultur gewonnen, welche einem anschließenden Verdau durch eine Restriktionsendonuklease zugeführt wurden. Pro BAC wurden aus mindestens einem untersuchten Klon, bei unterschiedlichen Restriktionsverdaumustern bis aus zu zwei verschiedenen Einzelkolonien, Stockkulturen angefertigt.

Mini - Präparationsprotokoll

Die *Escherichia coli*-Kulturen wurden in 96-well-Platten in LB-Medium (10g/l Trypton; 5g/l Hefeextrakt; 10g/l NaCl; pH7,5) mit den oben beschriebenen Antibiotikakonzentrationen schüttelnd kultiviert. Das durch Zentrifugation aus 3 ml Übernachtskultur gewonnene Pellet wurde auf Eis mit je 200 µl der Lösungen 1 (10 mM EDTA), 2 (1% SDS; 0,2 N NaOH) und 3 (1,875 M KOAc; 1/8,7 Vol Eisessig) versetzt und jeweils gut gemischt. Vorhandene Schwebstoffe wurden durch eine 20minütige Zentrifugation bei 13000 rpm abgetrennt. Die im Überstand enthaltene DNA wurde durch Fällung mit 0,7 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 20 min gewonnen, das entstehende Pellet nach einem Waschschriff mit 0,5 ml 70% EtOH in 20 µl dH₂O gelöst.

Restriktionsverdau

Der Verdau von 5 µl Minipräparations-DNA wurde unter Verwendung des SuRE/Cut-Puffer H (Roche) und 10 U des Restriktionsenzym Eco RI (Boeringer Mannheim) in einem Gesamtansatz von 15 µl für 90-120 min bei 37°C durchgeführt. Die entstandenen Proben wurden in einem 0,8%igen Übernachts-Agarosegel analysiert. Bei völliger Übereinstimmung aller drei Fragmentgemische wurde die Kontamination der Stichkultur ausgeschlossen und die DNA von einer beliebigen Einzelkolonie präpariert. Differierte das Restriktionsergebnis einer Spur von den beiden übrigen, wurde eine der beiden Kolonien mit identischem Fragmentmuster für die Maxi-Präparation gewählt. War keine Auftrennung einer anderen gleich, wurde auf die DNA-Präparation dieses BACs verzichtet.

Anfertigen von Glycerol-Stocks

500 µl aus einer TB (12 g/l Bactotrypton; 24 g/l Hefe-Extrakt; 4 ml/l Glycerin; 0,017 M KH₂PO₄; 0,072 M K₂HPO₄)-Übernachtskultur der selektierten Klone wurden mit 500 µl 100% Glycerol durchmischt und bei -80°C aufbewahrt.

Maxi-Präparationsprotokoll

200 ml TB-Medium plus 12 µg/ml Chloramphenicol wurden mit Einzelkolonien der zu kultivierenden BACs angeimpft. Die Bakterien vermehrten sich innerhalb von 12-18 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Danach wurde die Kultur während 5 min bei 6 k im GSA-Rotor pelletiert und in eiskaltem 10 mM EDTA aufgenommen. Nach völligem Resuspendieren wurden der Lösung 0,15 N NaOH und 0,75% SDS zugegeben und die Mischung wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Eiskaltes KOAc wurde anschließend zu einer Konzentration von 1 M hinzugefügt und das Reaktionsgemisch wurde nach 15-minütiger Inkubation auf Eis für weitere 15 min bei 10 k zentrifugiert. Dem Überstand wurden durch einen zweiten Zentrifugationsschritt noch verbleibende Zelltrümmer entnommen. Nach der anschließenden Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol wurde die nun ausgefallene DNA durch 15 min Zentrifugation bei 5 k pelletiert und in 10 mM Tris /

50 mM EDTA resuspendiert. 2,5 M KOAc wurden hinzugefügt und die Mischung lagerte dann für 30 min bei -80°C . Die angetauten Proben wurden 10 min bei 7 k zentrifugiert und der Überstand wurde mit EtOH versetzt. Die erneut ausfallende DNA wurde 10 min bei 3500 rpm pelletiert, in 50 mM Tris / 50 mM EDTA aufgenommen und die verbliebene RNA mit 0,14 mg/ml RNase 3 h lang bei 37°C verdaut. Die DNA wurde über zwei Phenol / Chlorophorm-Extraktionsschritte und eine Chlorophorm-Extraktion isoliert, mittels Isopropanol gefällt, mit 70% EtOH gewaschen (siehe 4.2.1) und in TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5 / 1 mM EDTA) gelöst. Nach einer zweiten Fällung mit 0,1 M NaCl und 3-fachem Volumen 100%igem EtOH und einmaligem Waschen mit 70% EtOH wurde die DNA in 200 μl TE aufgenommen. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde im Spektrophotometer bestimmt und die zytogenetische Lokalisation der Probe wurde durch Hybridisierung der mittels Nick-Translation markierten DNA auf normalen Metaphasen überprüft.

3.2.3 DOP-PCR-Reaktionen für Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Mittels hochauflösender Zweifarben-Durchflußzytometrie separierte Maus-Chromosomen erhielten wir von Prof. Dr. Malcolm Ferguson-Smith, (Department of Clinical Veterinary Medicine, Centre for Veterinary Science, Veterinary Cytogenetics, Cambridge, United Kingdom). Dieses Ausgangsmaterial wurde per DOP-PCR („Degenerate-Oligonucleotide-Primed-Polymerase-Chain-Reaction“) in drei Stufen amplifiziert. Die DOP-PCR wird benutzt, um komplexe genomische DNA mit guter Repräsentativität zu amplifizieren (Telenius *et al.*, 1992). Der degenerierte Primer bindet etwa alle 300-3000 bp an genomische DNA. Durch PCR werden die Sequenzen zwischen zwei gebundenen Primern vervielfältigt. Es resultiert ein komplexes Gemisch von 200 bp bis 2 kb langen Fragmenten, die die genomische DNA zwar unvollständig, aber für unsere Experimente ausreichend repräsentieren. Alle DOP-PCR-Schritte wurden mit dem Mouse UN1-Primer (Midland Certified Reagent Co.) mit der Sequenz: 5'-CGG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C-3' in der PCR-Maschine PTC-100 (MJ Research, Inc.) durchgeführt. Nach jeder PCR-Reaktion wurde ein Teil des Produktes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um den Erfolg der Amplifikation zu prüfen.

Primäre PCR

Zu jeweils ca. 500 mittels Durchflußzytometrie separierten Chromosomen wurden 1 x PCR-Puffer (5 x D Puffer, Invitrogen), jeweils 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Boehringer Mannheim), 3 μM Maus-UN1-DOP-Primer und 15 U Super Taq Force (CPG Inc.) gegeben. Das Volumen wurde mit autoklaviertem Aqua dest. auf 50 μl aufgefüllt. Die primäre PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Schritt</u>	<u>Temp. (°C)</u>	<u>Minuten</u>
1.	93	10
2.	94	1
3.	30	1.5
4.	Ramp 30-70 ^a	3
5.	72	3
6.	Schritte 2-5, 4 mal	
7.	94	1
8.	56	1
9.	72	3 + 1 Sekunde/Zyklus
10.	Schritte 7-9, 34 mal	
11.	72	10
12.	4	endlos

^a Ramp: Aufheizzeit zwischen Primer-Annealing und Polymerasereaktion; in diesem Fall von 30 auf 70°C in 3 min

Sekundäre und tertiäre PCR

Jeweils 2 µl DNA (150-200 ng) des primären bzw. sekundären PCR-Produkts wurden mit 1 x Puffer D, 0,8 mM dNTP-Mix, 4 µM DOP-Primer und 5 U Taq Polymerase (CPG Inc.) versehen und in einer DOP-PCR amplifiziert. Die PCR wurde nach folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Minuten</u>
1	94	1
2	56	1
3	72	3 + 1 Sekunde / Zyklus
4	Schritte 1-3, 29 mal	
5	72	10
6	4	endlos

3.3 Markierung

Die DNA-Sonden für die Hybridisierungsexperimente wurden enzymatisch markiert. Im wesentlichen unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Markierung:

Direkte Markierung: In die Markierungsreaktion werden Nukleotide eingebaut, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind.

Indirekte Markierung: Zur Markierung werden mit Haptenen (Biotin und Digoxigenin) gekoppelte dUTPs verwendet, die nach der Hybridisierungsreaktion mit Avidin- bzw. Antikörper (Antidigoxigenin)- konjugierten Farbstoffen detektiert werden.

Beide Methoden besitzen Vor- und Nachteile. Bei der direkten Markierung tritt kaum Hintergrundfluoreszenz auf, da keine Entwicklung der Fluoreszenzsignale auf den Objektträgern notwendig ist. Allerdings ist die direkte Markierung mit den relativ großen Fluoreszenzmolekülen wegen ihres aus sterischen Gründen schwierigen Einbaus in der Enzymreaktion weniger effizient. Dadurch sind die erzielten Signalintensitäten der zu analysierenden DNA-Sonden relativ gering. Manche Moleküle (z.B. Cy5,5) sind so groß, daß sie aus sterischen Gründen sehr schlecht oder überhaupt nicht in einen DNA-Strang eingebaut werden können. Indirekte Markierung gewährleistet einen guten Einbau der mit kleinen Molekülen (Biotin oder Digoxigenin) markierten Nukleotide und ist durch den möglichen Einsatz verschiedener fluoreszierender Sekundärreaktionen in der Detektion flexibel. Die Signale können bei Bedarf durch einen zusätzlichen Antikörper bzw. Detektormolekül noch verstärkt werden. Die Antikörperreaktion verursacht allerdings eine gewisse Hintergrundfluoreszenz, da die Antikörper nicht ausschließlich mit ihrem korrespondierenden Antigen reagieren, sondern in geringerem Maße auch unspezifische Bindungen eingehen. In Tabelle 3.3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Nukleotide und (Fluoreszenz-) gekoppelten Proteine/Antikörper mit ihren Herstellern aufgelistet. Für die direkt markierten dUTPs und die fluoreszenzmarkierten Proteine/Antikörper sind die jeweiligen Emissionsmaxima der Fluoreszenzfarbstoffe angegeben.

Tabelle 3.3.1 Auflistung aller verwendeten Nukleotide und (Fluoreszenz-) gekoppelten Proteine/Antikörper. Die an das Protein Avidin gebundenen Farbstoffe wurden zur Detektion Biotin-markierter Nukleotide verwendet, die Antidigoxigenin-Antikörper zur Detektion Digoxigenin-markierter Nukleotide. Cy5,5-Antimäus-IgG wurde nach einem Zwischenschritt über Maus-Antidigoxigenin zur Fluoreszenzmarkierung Digoxigenin-markierter Nukleotide in der SKY verwendet.

Name	Hersteller	Emissionsmaximum
DEAC-dUTP	PerkinElmer Life science	476 nm
Rhodamine 110-dUTP	PerkinElmer Life science	535 nm
Tamra-dUTP	Applied Biosystems	576 nm
Spectrum Orange-dUTP	Vysis	588 nm
Texas Red-12-dUTP	Molecular Probes	603 nm
Cy5-dUTP	Amersham Life science	667 nm
Biotin-dUTP	Roche Applied Science	-
Digoxigenin-dUTP	Roche Applied Science	-
Avidin-FITC	Jackson	520 nm
Kaninchen Anti-Maus-TRITC	Jackson	570 nm
Ziege Anti-Kaninchen-TRITC	Jackson	570 nm
Avidin-Cy5	Jackson	667 nm
Ziege Anti-Maus Cy5	Jackson	667 nm
Anti-Maus-Cy5,5-IgG	Amersham Life science	694 nm
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector	-
Maus-Anti-Digoxigenin	Sigma	-

Für die direkten und indirekten Markierungen der für die beschriebenen Projekte eingesetzten DNA-Sonden wurden zwei enzymatische Methoden benutzt: DOP-PCR und Nick-Translation.

3.3.1 Markierung mittels DOP-PCR für Maus-SKY-Analysen

Die tertiären DOP-PCR-Produkte der 21 verschiedenen Maus-Chromosomen wurden durch spezifische Kombinationen von fünf unterschiedlichen Farbstoffen (Rhodamine 110, Texas Red, Spectrum Orange bzw. Tamra, Cy5 und Cy5,5) markiert. Insgesamt waren hierfür 45 Einzelreaktionen erforderlich (siehe Tabelle 3.3.2).

Das Protokoll zur Markierung der DNA-Sonden für die Markierung aller Mausechromosomen entspricht im wesentlichen dem der oben dargestellten DOP-PCR-Amplifikation. Für die Markierung wurden neben den Nukleotiden dATP, dCTP, dGTP und dTTP auch markierte dUTPs verwendet, die bei der DNA-Strang-Verlängerung statt des dTTPs eingebaut werden. Da die markierten Nukleotide aufgrund ihrer Größe nicht an jeder passenden Stelle eingebaut werden, wurden neben den markierten dUTPs auch unmarkierte dTTPs angeboten, um die DNA-Amplifikation zu gewährleisten. Die nicht-fluoreszierenden Haptene Biotin und Digoxigenin sind kleiner als die Fluoreszenzfarbstoffe. Deshalb wurden Biotin- und Digoxigenin-gekoppelte dUTPs in einer höheren Konzentration relativ zu unmarkierten dUTPs angeboten als die fluoreszierenden Nukleotide.

Die Einzelreaktionen wurden in einem 100 µl Ansatz mit 1 x D PCR-Puffer (Invitrogen), jeweils 0.1 mM dATP, dGTP und dCTP, 0,075 mM dTTP, 2 µM Maus-DOP-Primer ("UN1", Midland Certified Reagent Co., 5'-CGG ACT CGA GNN NNN NTA CAC C-3') und 5 U Taq Polymerase (CPG Inc.) durchgeführt. In eine Reaktion wurden 4 µl (400-600ng DNA) tertiäres PCR-Produkt eines Chromosoms und das entsprechende markierte Nukleotid (5 µM Rhodamine 110-dUTP, 5 µM Tamra-dUTP bzw. 5 µM Spectrum Orange-dUTP, 10 µM Texas Red-dUTP, 30 µM Biotin-dUTP oder 30 µM Digoxigenin-dUTP) eingesetzt.

Die Markierungsreaktion fand ebenso wie die sekundäre und tertiäre Amplifikation mittels des DOP-PCR-Programms (siehe Kapitel 3.2.3) in einer PTC-100 PCR-Maschine (MJ Research, Inc.) statt.

Die Fluoreszenzkombinationen für die einzelnen Chromosomen sind in Tabelle 3.3.2 aufgelistet.

Tabelle 3.3.2 Die Farbkombinationen aller 21 Mausechromosomen für die SKY-Analyse

Chromosom	Rhodamine 110	Spectrum Orange / Tamra	Texas Red	Biotin (Cy5)	Digoxigenin (Cy5,5)
1	+	+		+	
2				+	+
3		+			+
4	+	+	+		
5					
6		+	+	+	+
7		+		+	
8		+	+		
9					
10				+	
11			+	+	
12	+			+	+
13		+	+	+	
14		+		+	+
15	+	+			
16		+			
17			+		+
18	+		+	+	
19	+				+
X	+				
Y	+		+		

3.3.2 Markierung mittels Nick-Translation für Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) oder Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

Tumor-DNA und genomische Kontroll-DNA (für CGH) bzw. BAC-DNA (für FISH) wurden mittels Nick-Translation mit verschiedenen Fluorochromen oder Haptenen markiert. Im Verlaufe der Markierungsreaktion setzt das Enzym DNase I beliebige Einzelstrangbrüche (nicks), was dem zweiten Enzym, einer DNA-Polymerase, erlaubt, vom Nick ausgehend Nukleotide zu entfernen und einen neuen Strang zu synthetisieren, wobei auch die Haptene oder direkt markierten Nukleotide eingebaut werden. Durch die Aktivität der DNase I wird die hochmolekulare DNA gleichzeitig in kürzere Fragmente zerlegt. Die Fragmentlänge ist für die Qualität der Hybridisierung von Bedeutung. Sie wurde daher nach jeder Reaktion überprüft.

Auf Eis wurden 2 µg DNA mit 10 µl 10 x NT-Buffer (0,5 M Tris-HCL pH 8,0; 50 mM MgCl₂ mit 0,5 mg/ml BSA), 10 µl 10 x dNTP-Mix (jeweils 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP und 0,05 mM dTTP), 0,01M β-Mercaptoethanol, 40 µM Markierungs-dUTP (Biotin-16-dUTP, Digoxigenin-11-dUTP, DEAC-dUTP, Tamra-dUTP oder Cy5-dUTP), 10 U DNA Polymerase 1 (Roche) und 20 – 400 ng/ml DNase I versehen. Das Volumen wurde mit sterilem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Nach Mischen und anschließendem kurzen Abzentrifugieren fand die Reaktion für 1,5 bis 2 Stunden bei 15°C statt. Zur Überprüfung der Fragmentlänge wurde ein Teil des Produktes auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente sollten nach der Nick-Translation eine Länge von 300 bis 600 bp aufweisen. Waren die Produkte zu lang, so wurde erneut DNase zugegeben und der Reaktionsmix weitere 10 bis 20 Minuten bei 15°C inkubiert. Bei Erhalt idealer

Fragmentlängen wurde die Nick-Translation bei -20°C eingefroren oder direkt in einer Hybridisierung eingesetzt. Für die CGH-Experimente wurden die Tumor-DNAs mit Biotin-dUTP und die Kontroll-DNAs mit Digoxigenin-dUTP markiert. Zur Markierung der BAC-DNAs für FISH-Experimente wurden alle angegebenen markierten dUTPs verwendet.

3.4 Hybridisierung

3.4.1 Präparation der Objektträger

Die Vorbehandlung der Chromosomenpräparate zum Entfernen von RNA- und Zytoplasma-Resten war bei SKY-, CGH- und FISH-Analysen identisch. Vor der Hybridisierung wurden mittels eines Phasenkontrastmikroskops die Hybridisierungsareale ausgesucht. Zur Erzielung optimaler Ergebnisse eines SKY- bzw. CGH-Experiments ist eine ausreichende Anzahl an Metaphasen mit möglichst wenigen Chromosomen-Überlagerungen erforderlich. Kritisch ist ebenfalls die Menge des die Chromosomen umgebenden Zytoplasmas, deren Reduzierung das Hauptanliegen der Vorbehandlung ist. Zunächst wurden die Objektträger in 2 x SSC equilibriert und danach mit RNase A (0,1 mg/ml in 2 x SSC) für 45 min bei 37°C inkubiert. Die RNase-Behandlung ist notwendig, um die RNA-DNA-Hybridisierung zu verhindern und den Hintergrund zu reduzieren. Anschließend wurden die Objektträger für 3 x 5 min in 2 x SSC gewaschen. Zum Entfernen von Zytoplasmaresten wurden die Objektträger für 5 min mit auf 37°C vorgewärmter 0.01 M HCl-Lösung (pH 2.0) plus 3 bis 7 mg/ml Pepsin behandelt. Es folgten zwei 5 minütige Waschschrte in PBS. Unter einem Phasenkontrastmikroskop wurde die Menge eventuell verbliebenen Zytoplasmas überprüft und gegebenenfalls die Pepsinbehandlung fortgesetzt. Nach Waschen in PBS/MgCl₂ (0,05M MgCl₂ in PBS) wurden die Objektträger für 10 min in PBS/MgCl₂ plus 1% Formaldehyd fixiert und dann einmal in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70%, 90% und 100%igem Ethanol dehydriert und luftgetrocknet.

Damit die DNA-Sonden auf die Chromosomen hybridisieren können, benötigt man einzelsträngige Zielsequenzen; die DNA-Doppelstränge müssen also denaturiert werden. Die Denaturierung ist ein entscheidender Schritt. Werden die Chromosomen zu wenig denaturiert, so findet später keine oder eine ineffiziente Hybridisierung statt. Überdenaturierung führt andererseits zu einer schlechten Chromosomenmorphologie.

Die getrockneten Objektträger wurden mit 120 μl Denaturierungslösung (70% Formamid / 2 x SSC, pH 7,0) versetzt, mit 24 x 60 mm Deckgläsern abgedeckt und für 1 min 30 s auf einer Heizplatte auf 75°C erwärmt. Unter diesen Bedingungen erreichten wir eine für unsere Anwendungen ausreichende Denaturierung bei gleichzeitiger Erhaltung einer guten Chromosomenmorphologie. Direkt nach der Denaturierung wurden die Objektträger in eiskalten 70%igen Ethanol überführt und in 90% und 100%igem Ethanol dehydriert.

3.4.2 Hybridisierung der Sonden

Für SKY-Hybridisierungen wurden 160 µl (~16 µg) der Mischung aus allen einzelnen Markierungs-PCR-Produkten mit 50 µg Maus-C₀t-1 DNA versehen und gefällt.

Die Fällung der DNA für CGH-Hybridisierungen geschah wie folgt: 1 µg Maus-Tumor DNA, markiert mit Biotin via Nick-Translation, und 1 µg Maus-Kontroll-DNA, markiert mit Digoxigenin, wurden zusammen mit jeweils 0,2 µg Nick-Translationsprodukt von 10 Cy5-markierten BAC-Klonen (zur sicheren Identifizierung der Mauschromosomen) und 50 µg Maus-C₀t-1 DNA gefällt.

Für FISH-Experimente wurden jeweils 0,2 µg der unterschiedlich markierten BACs aus der Nick-Translation gemeinsam mit 10 µg C₀t-1 DNA (des Menschen oder der Maus) gefällt. In Experimenten, in denen eine Chromosomen-spezifische Paintingprobe erforderlich war, wurden der Fällung außerdem 0,5 µg Produkt der entsprechenden Markierungs-DOP-PCR zugegeben.

Den verschiedenen DNA-Gemischen wurden 10 µg Lachssperma-DNA und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat zugegeben. Das Gesamtvolumen wurde um das 3-fache mit 100%igem Ethanol erhöht. C₀t-1 DNA dient als Kompetitor zur Suppression der repetitiven DNA; Lachssperma-DNA erleichtert die Fällung. Nach gründlichem Mischen fand die Fällung bei -20°C für mindestens 1 Stunde statt und im Anschluß wurde das Präzipitat bei 13.000 rpm und 4 °C für 30 min in einer Heraeus-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift des Pelletts mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellett bei 37°C getrocknet, bevor es in 10 µl Hybridisierungsmix (1/2 Volumen deionisiertes Formamid, 20% Dextransulfat in 2 x SSC, pH 7,0) aufgenommen wurde. Bei 37°C und unter ständigem leichtem Schütteln löste sich die DNA in dem Formamidgemisch vollständig. Formamid im Hybridisierungsmix erniedrigt die Hybridisierungstemperatur. Formamid und SSC dienen zur Einstellung der Stringenz. Eine hohe Formamidkonzentration bzw. eine niedrige Salzkonzentration erhöhen die Stringenz. Dextransulfat verringert das Volumen, in dem die Sonde gelöst ist und erhöht so die Sondenkonzentration in der Hybridisierungslösung.

Bei 85°C wurde die Probe für 6 min denaturiert, kurz zentrifugiert und für SKY- und CGH-Experimente für eine Stunde bei 37°C prähybridisiert.

Auf die luftgetrockneten, frisch denaturierten Objektträger wurde nun die DNA-Sonde aufgetragen, mit einem Deckglas (18 x 18 mm) versehen und mit Fixogum luftdicht abgeschlossen. Die Hybridisierung fand bei 37°C über Nacht statt.

3.5 Detektion

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger für 3 x 5 Minuten in FA/SSC (50% Formamid in 2 x SSC; pH 7,0) bei 45°C gewaschen. Darauf folgten 3 x 5 min waschen in 0,1 x SSC bei 60°C (für CGH und FISH) beziehungsweise in 1 x SSC bei 45°C (für SKY). Die Stringenz der Waschlösungen ist abhängig von der Formamid- und Salzkonzentration und von der Temperatur. Die Stringenz wird durch zunehmende Formamidkonzentration, abnehmende Salzkonzentration und zunehmende Temperatur erhöht. Die Waschschr

nach der Hybridisierung erfolgen unter stringenteren Bedingungen als die Hybridisierung, um lose gebundene Sonden zu entfernen und nur perfekt oder nahezu perfekt gepaarte Hybridmoleküle übrig zu lassen. Eine zu hohe Stringenz der Waschlösung kann zum Verlust des Hybridisierungssignals führen.

Die Objektträger wurden anschließend mit 4 x SSC / 0,1% Tween 20 benetzt, mit 120 µl Blocking Lösung (3% BSA in 4 x SSC/Tween 20) bedeckt, mit Deckglas versehen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch diesen Schritt sollen unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper auf den Chromosomen geblockt werden. Danach wurden die Objektträger kurzzeitig in 4 x SSC/Tween 20 überführt und mit der ersten Antikörper- bzw. Avidinlösung bedeckt. Die Reaktionen wurden jeweils mit 50 ng Antikörper/Avidin in 4 x SSC / Tween 20 in einem 120 µl Volumen je 45 min bei 37°C durchgeführt. Je nach Art des Experiments folgten der ersten Antikörper/Avidin-Reaktion noch eine zweite und dritte Reaktion. Nach jeder Reaktion wurden ungebundene(s) Antikörper/Avidin in jeweils 3 x 5 Minuten mit 4 x SSC/Tween 20 abgewaschen. Die Antikörper/Avidin-Zusammenstellungen sind im Detail:

für CGH-Analysen:

1. Reaktion: Avidin-FITC (bindet an Biotin) und Maus anti-Digoxigenin (bindet an Digoxigenin)
2. Reaktion: Biotinyliertes anti-Avidin (bindet an Avidin) und TRITC Kaninchen anti-Maus (bindet an Maus anti-Digoxigenin)
3. Reaktion: Avidin-FITC (bindet an Biotin) und TRITC Esel anti-Kaninchen (bindet an Kaninchen anti-Maus)

für SKY-Analysen:

1. Reaktion: Avidin-Cy5 (bindet an Biotin) und Maus anti-Digoxigenin (bindet an Digoxigenin)
2. Reaktion: CY5.5 anti-Maus (bindet an Maus anti-Digoxigenin)

für FISH-Analysen:

abhängig vom spezifischen Experiment, z.B.:

1. Reaktion: Avidin-FITC (bindet an Biotin) und Maus anti-Digoxigenin (bindet an Digoxigenin)
2. Reaktion: Ziege anti-Maus-Cy5 (bindet an Maus anti-Digoxigenin)

Die direkt markierten Sonden wurden nicht detektiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Chromosomen mit 1 µg / 100 ml DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) in 2 x SSC für 10 Minuten gefärbt. Überschüssiger DAPI-Farbstoff wurde durch Waschen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten entfernt. Die Objektträger wurden in der Alkoholreihe dehydriert, an der Luft getrocknet und letztlich mit 32 µl Antifade (1mg/ml 1,4-Phenylendiamin pH 8,0 und 80% Glycerol in PBS) eingedeckt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert in die DNA. Die Chromosomen werden dadurch im Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Das Antifade verringert das Ausbleichen der Präparate

während der Beurteilung und der Bildaufnahme am Fluoreszenzmikroskop. Die Objektträger wurden im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

3.6 Auswertung der SKY-Experimente

Das SKY-System (ASI, Applied Spectral Imaging Inc., Migdal Ha'Emek, Israel) setzt sich aus mehreren Einzelbausteinen zusammen. Für die Aufnahmen stand ein Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems DM RXA, Wetzlar, Deutschland) bereit, ausgestattet mit einer 75W Xenonlampe (Osram-Zeiss), einem 63x Ölimmersionsobjektiv (Leica) und einem speziell entwickelten SKY-Filter (v. 3.0, Chroma Technology Corporation, Brattleboro, VT). Das Mikroskop war über den C-Mount-Adapter mit dem optischen Kopf verbunden. Dieser bestand aus einem Fouriertransformspektrometer (SpectraCube™, Applied Spectral Imaging Inc.) und einer CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, AZ). Beide waren über Controller mit dem Computer verbunden und wurden simultan gesteuert. Es wurden jeweils ein spektrales Bild und ein DAPI-Bild mit Hilfe des Softwarepakets SpectraView, Version 1.6.2, aufgenommen. Die Bildanalysen erfolgten mit Hilfe der SKYView-Software, Version 1.6.2 (Applied Spectral Imaging Inc.).

3.7 Auswertung der CGH- und FISH-Experimente

Für die Auswertung der CGH-Experimente wurden mittels einer gekühlten CCD- (charge-coupled device) Kamera an einem DM RXA-Epifluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems DM RXA, Wetzlar, Deutschland) von jedem Tumor 15 Metaphasen aufgenommen. DAPI-, FITC-, TRITC- und Cy5- Emissionen wurden mit Hilfe von Bandpass-Filtern und der FISH-Software CW4000, Version V1.2 (Leica, Cambridge, UK) aufgenommen. Die Analyse wurde mittels der QCGH-Software (Leica) durchgeführt. Die Intensitäten der FITC- und TRITC-Emissionen wurden analysiert und die FITC / TRITC-Raten bestimmt. Die invertierten DAPI-Bilder und die Cy5-Signale dienten der Chromosomenidentifizierung.

Die Aufnahme der FISH-Bilder erfolgte wie für CGH-Bilder beschrieben, allerdings wurden zusätzlich DEAC- und Tamra-spezifische Filter eingesetzt. Die Auswertung fand hier mit dem CW4000 FISH-Programm statt.

3.8 Kartierung der CFSs

Die CFS-Expression wurde in T- und B-Lymphozyten von Mäusen der Stämme C57BL/6 (zwei weibliche, drei männliche Tiere) und BALB/c (drei weibliche, zwei männliche Tiere) kartiert. Durch den Zusatz von APC in den Endkonzentrationen 0,2 μM und 0,4 μM zum Kulturmedium wurde die Expression der CFSs induziert. Jeweils eine APC-freie Zellkultur pro Maus diente der Analyse spontaner Läsionen. Die Präparation der Chromosomen erfolgte wie in Kapitel 3.1 beschrieben. Um eine sichere Identifizierung der mitunter stark beschädigten oder rearrangierten Chromosomen oder Chromosomenstücke zu gewährleisten, wurden SKY-Analysen der APC-behandelten Zellen durchgeführt. Die Kartierung der CFSs erfolgte an DAPI-gebänderten Chromosomen.

Pro Maus und APC-Konzentration wurden etwa 25 komplette Chromosomensätze ausgewertet. Da die Metaphasen pro mikroskopischem Aufnahmegebiet in den APC-behandelten Gruppen häufig inkomplett waren, mußten hierfür oft deutlich mehr als 25 Bilder ausgewertet werden. Basierend auf der Definition für CFSs von Smeets & van de Klundert (1990) wurden sämtliche Läsionen gezählt, welche entweder als deutliche Lücke im Chromatin, als Doppelstrangbruch oder durch den Austausch von chromosomalem Material zu sehen waren. Die jeweilige Bandenposition und die Art der Läsionen sowie die Zahl von intakten Chromosomen wurden notiert.

3.9 Statistische Berechnung

Für die Beurteilung der CFSs wurden anhand der DAPI-Bänderung insgesamt 392 Chromosomenbanden unterschieden. Für jede dieser Banden gingen die Anzahl der beobachteten APC-induzierten CFSs (a), die Summe der analysierten Chromosomen (b) und die Größe der Bande (c) in die statistische Berechnung ein. Die Analyse wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Microsoft Excel durchgeführt.

Da die b-Werte zwischen den verschiedenen Chromosomen unterschiedlich, aber stets nahe 1000 (10 Mäuse und zwei APC-Konzentrationen mit jeweils etwa 50 analysierten Chromosomen) waren, wurde a zu d normalisiert: $d = (1000/b) \cdot a$.

Die bei zufälliger Verteilung zu erwartende Anzahl der CFSs für eine spezifische Bande (e) wurde wie folgt errechnet: $e = \text{Summe der d-Werte aller Banden} \cdot (c / \text{Summe der c-Werte})$.

Die P-Werte wurden mit Hilfe der Binomialverteilung für erhöhte CFS-Expression (P_i) nach der Formel: $P_i = 1 - \text{BINOMVERT}(a, b, e/1000, \text{WAHR}) + \text{BINOMVERT}(a, b, e/1000, \text{FALSCH})$ errechnet. Demgegenüber standen die P-Werte für sehr geringe CFS-Expression (P_d): $P_d = \text{BINOMVERT}(a, b, e/1000, \text{WAHR})$. Banden wurden als extrem fragil bzw. stabil eingestuft, wenn ihre P_i bzw. P_d -Werte die Bonferroni-Schranke (0,05/392) unterschritten.

Die Berechnung der stabilen Banden des humanen Genoms mit 320 unterscheidbaren Chromosomenbanden erfolgte auf dieselbe Weise.

Die nichtparametrischen statistischen Tests Mann-Whitney U-Test, gepaarter Wilcoxon-Test und Spearman-Test wurden unter Nutzung der Software Statistica/w 5.0 angewandt.

Der Mann-Whitney U-Test wurde verwendet, um jeweils zwei Gruppen ungepaarter Werte auf signifikante Unterschiede zu prüfen. In dieser Arbeit diente er dem Vergleich der Tumorlatenzen und der ANCA-Werte der verschiedenen Lymphomgruppen, der Therapieerläufe der Tumore in Abhängigkeit chromosomaler Aberrationen, der CFS-Expression zwischen BALB/c und C57BL/6, und zwischen Zentromer- und nicht-Zentromerbanden, der Anzahl der Synteniebruchpunkte zwischen CFSs und Kontrollregionen, und der Anzahl von Inseln und Klustern erhöhter DNA-Helix-Flexibilität in CFSs und Kontrollregionen.

Mittels des gepaarten Wilcoxon-Tests wurde der APC-bedingte Anstieg der CFS-Expression untersucht.

Für sämtliche Korrelationsanalysen – Korrelation der CFS-Häufigkeiten und der CV-Werte der chromosomalen Banden von BALB/c und C57BL/6 und von Maus und Mensch, Korrelation der Expressionshäufigkeiten der konservierten CFSs, Korrelation der Anzahl von Inseln und Klustern erhöhter DNA-Helix-Flexibilität zwischen homologen Maus/Mensch-CFSs und Korrelation der CFS-Expressionshäufigkeiten des humanen Chromosoms 7 mit klinisch relevanten Bruchereignissen – wurde der Spearman-Test verwendet.

Kaplan-Meier-Kurven zur Verdeutlichung der Therapieergebnisse von c-myc-aktivierten Lymphomen wurden ebenfalls mit Hilfe der Software Statistica/w 5.0 angefertigt.

3.10 Verwendung öffentlich zugänglicher Datenbanken

Tumor-assoziierte und nicht-Tumor-assoziierte chromosomale Bruchpunkte sowie segmentale Duplikationen auf Chromosom 7 wurden der öffentlichen Datenbank “The Chromosome 7 Annotation Project” (www.chr7.org, Version Juni 2004, Scherer *et al.*, 2003) entnommen. Das Auffinden evolutionärer Bruchpunkte erfolgte mit Hilfe der Datenbank Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org, Versionen November 2002 und Juli 2004).

Alle Maus- und Mensch-Sequenzen, ihre Zuordnung zu zytogenetischen Banden, sowie die Lage von BACs, STS-Markern (Sequence Tagged Site), Genen und CpG-Inseln wurden der Datenbank UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>, Mensch und Maus: Version Mai 2004, Lander *et al.*, 2001; Waterston *et al.*, 2002) entnommen.

Die Zuordnung von Sequenzdaten der Maus zu ihren entsprechenden zytogenetischen Positionen bedurfte zusätzlicher Datenbanknutzung. Anders als für die menschliche Sequenz-Bandenzuordnung, bei der Ergebnisse aus BAC-Kartierungs-Studien einbezogen wurden, sind im UCSC Genome Browser für die Maus keine solchen Angaben zu finden. Aufgrund der daraus resultierenden Unsicherheiten wurden für die Maus stets zusätzlich Kartierungsdaten von Genen aus dem NCBI LocusLink (National Center for Biotechnology Information, <http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>) genutzt. Für die genaue Festlegung der Bandengrenzen für die errechneten stabilen Banden (Kapitel 3.9)

betrachteten wir die Verteilung der Gendichte bzw. CpG-Insel-Dichte über das gesamte Chromosom. In R-Banden ist die Gendichte, und mit ihr die Dichte an CpG-Inseln, hoch. In G-Banden findet man dagegen nur wenige Gene. Diese Korrelation von Giemsa-Färbung und Gendichte ist im Humangenom deutlich zu erkennen. Durch die Kombination von Genkartierungsdaten und Gendichteverteilungen war es uns somit möglich, den entsprechenden Mausbanden die zugehörigen Sequenzen zuzuordnen.

Die Genexpressionsdaten entstammen der Datenbank GNF SymAtlas (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>, Version 0.8.0; Su *et al.*, 2002). Sie beruhen auf Analysen von jeweils 200 ng Gesamt-mRNA der verschiedenen Gewebe und Zelltypen, die Fluoreszenz-markiert und auf Oligonukleotid-Arrays hybridisiert wurden. Daher können die Expressionswerte verschiedener Gene in einem Gewebe/Zelltyp direkt miteinander verglichen werden. Da die Wertangaben auf relativen Fluoreszenzintensitäten beruhen (der Durchschnittswert der Arrays wurde auf 200 skaliert), besitzen diese keine Einheit. Werte unterhalb von 100 galten als Hintergrund. Die in dieser Studie aufgelisteten Werte der T-Lymphozyten beruhen auf Ergebnissen für Pb-CD4+ T-Zellen und Pb-CD8+ T-Zellen. Die der Hautfibroblasten, Amniozyten und Knochenmarkzellen jeweils auf Daten aus Haut, Plazenta und Knochenmark. Für Gene mit mehr als einem verfügbaren RNA-Expressionsexperiment wurde der Mittelwert aus den angegebenen Einzelergebnissen gebildet.

3.11 Computeranalyse der DNA-Helix-Flexibilitäten

Die DNA-Helix-Flexibilität stellt ein Maß für potentielle lokale Variationen in der DNA-Struktur dar, ausgedrückt als Schwankungen im Biegungswinkel des Moleküls. Das gehäufte Vorkommen von Inseln mit erhöhter DNA-Helix-Flexibilität gilt als CFS-spezifische Eigenschaft. Daher wurden mit Hilfe des Programms TwistFlex die DNA-Helix-Flexibilitätswerte für alle molekular kartierten humanen und Maus-CFSs und für stabile Kontrollbanden berechnet (diese Analyse hat der Biostatistiker Klaus Hermann durchgeführt). Basierend auf den Daten von Sarai *et al.* (1989) wurden dabei die mittleren Schwankungen im Biegungswinkel für jedes der möglichen Dinukleotide erstellt, und somit die Berechnung der Flexibilität einer DNA-Sequenz durch Addition dieser Werte und Division durch die Sequenzlänge ermöglicht. Für die Durchführung der Analyse wurde das Programm TwistFlex genutzt (bereitgestellt von Prof. Batsheva Kerem, <http://www.oldjail.cs.huji.ac.il/~netab/>). Für die Analyse wählten wir die identischen Parameter, wie sie in den Studien Mishmar *et al.*, 1998 und Zlotorynski *et al.*, 2003 verwendet wurden. Die Fenstergröße zur Berechnung der DNA-Helix-Flexibilität betrug 100 bp. Die Schrittgröße von 1 bp, also das Voranschreiten des Fensters auf der Gesamtsequenz in minimalen Schritten, garantierte die maximale Genauigkeit der Berechnung. Die einzelnen Dinukleotidwerte wurden innerhalb eines Fensters summiert und durch die Fenstergröße gemittelt. Fenster mit gemittelten Werten $>13.7^\circ$ wurden als Inseln erhöhter Flexibilität betrachtet. Dieser Flexibilitätswert lag signifikant über dem Durchschnittswert der analysierten Sequenzen ($P < 0,0001$) (Mishmar *et al.*, 1998; Zlotorynski *et al.*, 2003). Da die Fenstergröße 100 bp betrug, wurden flexible Regionen, welche <100 bp voneinander entfernt waren einer gemeinsamen flexiblen Insel zugeordnet.

Dem Beispiel von Zlotorynski *et al.*, 2003 folgend wurden die flexiblen Inseln und die Kluster flexibler Inseln (definiert als eine Folge von mindestens drei flexiblen Inseln mit einem Abstand von ≤ 5 kb zwischen zwei benachbarten Inseln) gezählt.

4 Ergebnisse

4.1 Molekular-zytogenetische Charakterisierung muriner B-Zell Lymphome

Unser Ziel war es, den Karyotyp von Lymphomen mit bekanntem *INK4a/ARF*-Genotyp zu charakterisieren. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Tumore rekurrente Chromosomentranslokationen für die nachfolgende funktionelle Analyse von CFSs aufwiesen. Außerdem sollten alle zytogenetisch erkennbaren Aberrationen bestimmt werden, um neue Aspekte der Wirkungsweisen von *INK4a* und *ARF* bei der Tumorentstehung aufzuzeigen. Zudem sollte nach Markern für therapierelevante Subklassifizierungen *INK4a/ARF*-defizienter Tumore gesucht werden. Zu diesem Zweck wurden 38 primäre *Eμ-myc* transgene Lymphome, davon 15 *ARF*null-, 17 *INK4a/ARF*null- und 6 Kontroll-Lymphome (siehe Kapitel 1.2.2), mittels einer Kombination der molekular-zytogenetischen Methoden CGH, SKY und (Interphase-)FISH untersucht.

Die SKY-Analyse erlaubt Aussagen über die strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen in einzelnen Tumorzellen. Pro Tumor wurden 20 bis 30 Metaphasen ausgewertet. Anhand der CGH-Ergebnisse wurden die zytogenetischen Positionen der Gewinne und Verluste, die in mindestens 40% der Tumorzellen auftraten, kartiert. Die Kombination beider Methoden ermöglicht daher eine umfassende Charakterisierung des Karyotyps der Tumore.

Zur Beantwortung spezifischer Fragestellungen einzelne Loci betreffend wurden außerdem FISH-Experimente durchgeführt.

Die CGH-Profile zeigten in allen untersuchten Lymphom-Fällen einen Verlust der Telomerregion des Chromosoms 12. Kontrollexperimente belegten, daß dieser sich durch die vergleichende Hybridisierung von DNA des Mausstammes C57BL/6 (Tumore) mit BALB/c-Kontroll-DNA begründete und somit keine Aberration der Lymphome darstellte.

Abbildung 4.1.1 zeigt beispielhaft die SKY- und CGH-Auswertung für einen *ARF*null- und einen *INK4a/ARF*null-Tumor.

Die Chromosomenaberrationen der untersuchten Tumore, basierend auf den Ergebnissen der SKY- und CGH-Analysen, sind in Tabelle 4.1 zusammengestellt. Dabei ist zu beachten, daß die Tumore generell aus mehreren Klonen bestanden, welche neben gemeinsamen auch individuelle Aberrationen aufwiesen. Tabelle 4.1 beinhaltet die Summe aller gefundenen Aberrationen pro Lymphom.

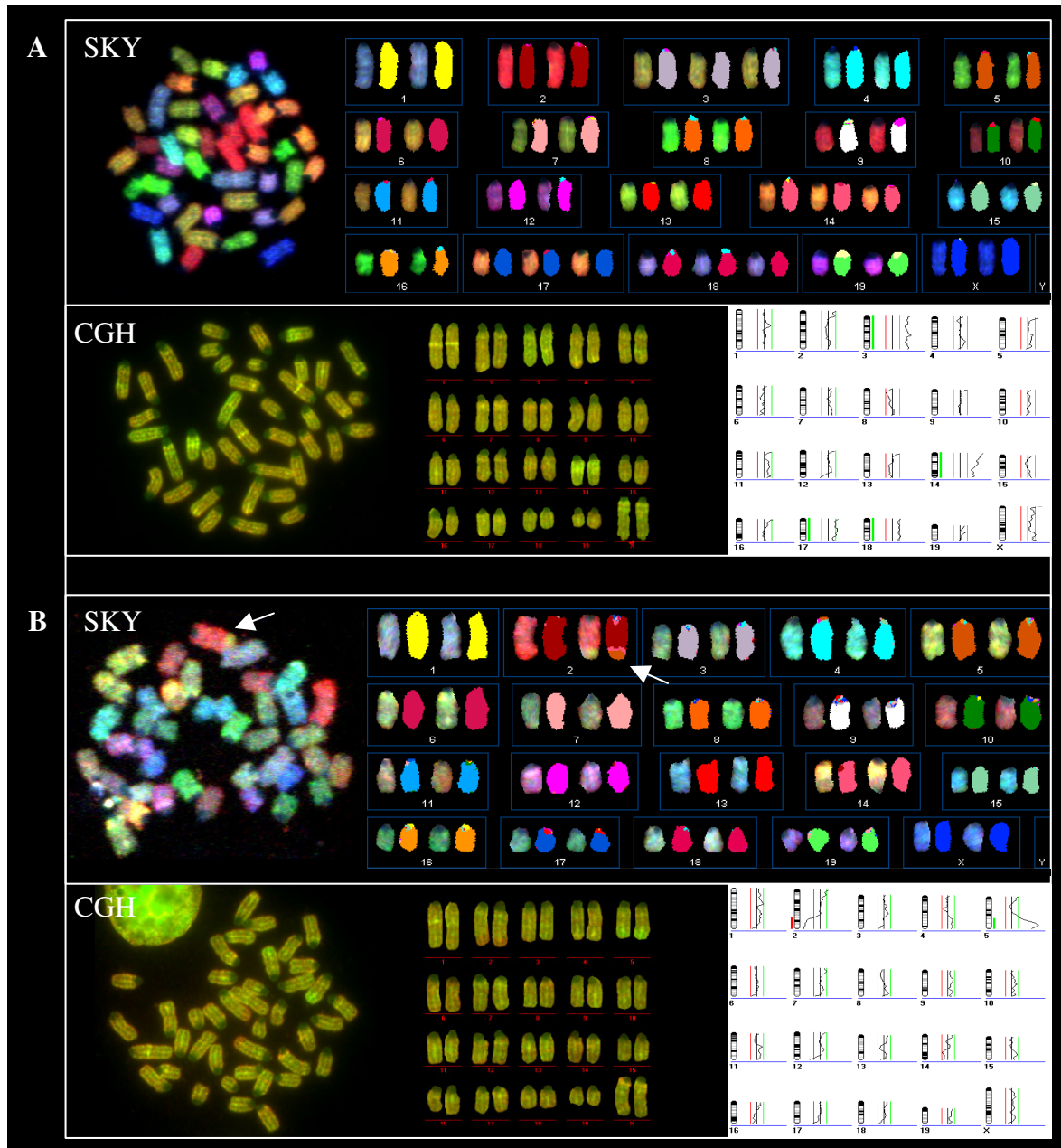


Abbildung 4.1.1 Molekular-zytogenetische Charakterisierung am Beispiel des *ARF*null-Lymphoms A8 (A) und des *INK4a/ARF*null-Lymphoms IA12 (B). Die oberen Abbildungen stellen das SKY-Ergebnis jeweils einer Metaphase (Metaphase links und Karyogramm rechts) dar. Das SKY-Karyogramm zeigt die Chromosomen in der spektralen und in der klassifizierten Darstellung. Die unteren Abbildungen repräsentieren die CGH-Analysen (von links: Metaphase, Karyogramm und Profil). Im Profil sind Gewinne als grüne Balken rechts und Verluste als rote Balken links des Ideogramms dargestellt.

Durch die Kombination der SKY- und CGH-Analysen wurden im Tumor A8 ein Zugewinn der Chromosomen 3, 14, 17 und 18 gefunden. Der Tumor IA12 wies eine Translokation Der(2)T(2F3;5E5/F) mit der hemizygoten Deletion 2F3-tel und einer Trisomie 5E5/F-tel auf. Das Translokationschromosom ist in der SKY-Metaphase und im SKY-Karyogramm durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Tabelle 4.1 Die Tumorlatenzen und chromosomalen Aberrationen der primären *ARF*null-, *INK4a/ARF*null- und Kontrolllymphome und die Remissionszeiten der entsprechenden Tumore nach CTX-Behandlung der Empfänger-mäuse.

Genotyp	Lymphom	Latenz [Tage]	Zytogenetische Aberrationen	Remissionsdauer [Tage]
<i>ARF</i> null	A1	26	+16,+Der(4)T(4B;5E5/F)	100, 100
	A3	67	-Y,+3,+14,+17,Del(10B1-2)	25, 100
	A4	93	+12,+14,+15,+16	100
	A5	43	+6,+18,+19	20, 21
	A6	53	-Y,+1(++A-C),+3,+14	100
	A7	39	-Y,+1,+3,+14	100
	A8	57	+3,+14,+17,+18	100
	A9	43	+3,+14,-13A4-C2	100
	A10	64	+3,+15,Der(17)T(5E5/F;17E1)	n.a.
	A11	71	+1,+3,+14	n.a.
	A12	46	+6	26, 34
	A13	46	Der(2)T(2H;10C)	n.a.
	A14	45	+3,+18,Del(19A)	n.a.
	IA3	34	+3,+14	58
	IA7	28	+3,+18	20
<i>INK4a/ARF</i> null	IA1	29	normal	100
	IA2	30	+1,+3	n.a.
	IA4	30	+3	24, 74
	IA5	24	+1,+6	14, 21, 21
	IA6	35	Der(2)T(2F3;5E5/F)	n.a.
	IA8	38	+3,Del(13A3-C1)	n.a.
	IA9	39	+3 (++A-F2),Dup(XA4-F2)	37
	IA10	33	+18	19, 19
	IA11	n.a.	+1,+3(++3F),+Del(5)(A2-E5/F)	24
	IA12	n.a.	Der(2)T(2F3;5E5/F)	16
	IA13	n.a.	+18,Dup(9)(A-D)(+9A1-4)	0
	A2	26	+Der(2)	16
	C1	107	+18,+Del(5)(A2-E5/F)	14, 18
	C2	156	+6	14
	C3	109	+/-X,+/-Y,+12,+16, +17,+18,+19,T(1C4;6B3)	n.a.
	C6	95	+3	20
	C9	98	+3,+15,+18	n.a.
Kontrollen	C4	59	+3,+14,+19	n.a.
	C5	49	+3,+6,+7,+/-10,+12,+18	45
	C7	241	+3,+15,+18	n.a.
	C8	107	+12	20
	C10	68	+3,+10,+14,+15,+16,+18	20
	C11	n.a.	-Y,+3,+5,+12,+16,+18,+19	100, 100

Die Bezeichnung der *Eu-myc*-transgenen Lymphome bezieht sich auf *ARF*+/- -Tiere (An), *INK4a/ARF*+/- -Tiere (IA_n) und *INK4a/ARF*+/+ -Tiere (C_n). Die zytogenetischen Aberrationen wurden als Gewinne (+, Duplikation [Dup]), Verluste (-, Deletion [Del]), Translokationen (T), oder aberrante Chromosomen (Derivat [Der]) zusammengefaßt und unter Berücksichtigung der „rules for the nomenclature of chromosome aberrations in mice“ (Davisson, 1997) beschrieben. Die therapeutische Behandlung der transplantierten Tumore wurde von Schmitt *et al.* an ein bis drei Empfänger-mäusen durchgeführt. N.a., keine Daten verfügbar.

Unabhängig von ihrem *INK4a/ARF*-Genotyp entwickelten nahezu alle Tumore (37 von 38 untersuchten Fällen) zusätzlich zu den Mutationen am *CDKN2A*-Lokus und dem aktivierten c-myc molekular-zytogenetisch detektierbare Chromosomenaberrationen. Polyploidien wurden nicht beobachtet. Gewinne spezifischer Chromosomen traten sehr viel häufiger auf als Verluste. Die durchschnittliche Anzahl chromosomaler Aberrationen pro Tumor (ANCA, average number of chromosomal aberrations) betrug $4,3 (\pm 2,3)$ bzw. $2,9 (\pm 1,2)$ in Kontroll- und *ARF*null-Lymphomen (Mittelwerte \pm Standardabweichung); dieser Unterschied war nicht signifikant (Mann-Whitney U-Test, $P = 0,213$). Demgegenüber wurde in *INK4a/ARF*null-Tumoren ein ANCA-Wert von nur $1,9 (\pm 1,7)$ errechnet. Dieser Wert war signifikant geringer als die ANCA-Werte der *ARF*null- ($P = 0,009$) und Kontrolllymphome ($P = 0,027$). Auch relativ zur Tumoraltenz zeigten *INK4a/ARF*null-Lymphome noch signifikant weniger Alterationen (errechnet als individuelle "Anzahl chromosomaler Aberrationen / Latenz"-Werte) als die *ARF*null-Lymphome ($P = 0,020$).

Eine Übersicht über die Gesamtheit chromosomaler Gewinne und Verluste in den verschiedenen Tumorgruppen stellt Abbildung 4.1.2 dar.

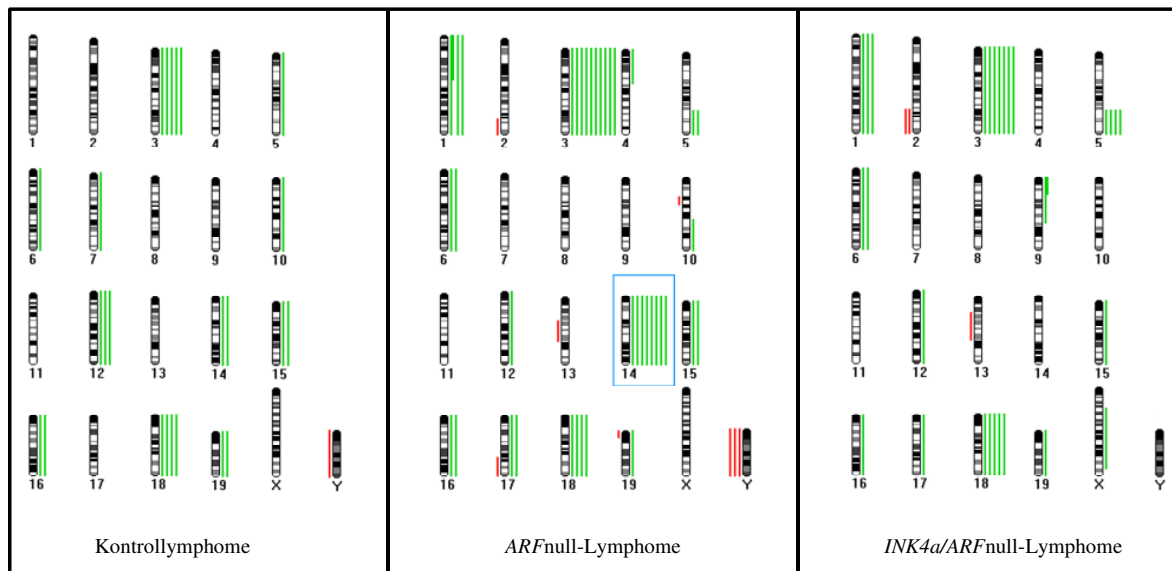


Abbildung 4.1.2 Ergebnisübersicht der molekular-zytogenetischen Untersuchungen der *ARF*null- ($n = 15$), *INK4a/ARF*null- ($n = 17$) und Kontrolllymphome ($n = 6$). Grüne Balken rechts der jeweiligen Chromosomen repräsentieren Gewinne und rote Balken links im Ideogramm symbolisieren verlorene Bereiche. Besonders auffällig ist der häufige Gewinn von Chromosom 14 in der *ARF*null-Gruppe, welcher in keinem der *INK4a/ARF*null-Fälle detektiert wurde. Rekurrente Aberrationen in mehreren Gruppen waren der Gewinn der Chromosomen 1, 3, 6 und 18, sowie der Gewinn der Region 5E5/F-tel.

In acht der 15 *ARF*null-Lymphome wurde ein Gewinn des Chromosoms 14 detektiert (siehe Fall A8 in Abbildung 4.1.1). Zusätzliche Chromosomen 14 wurden ebenso in zwei der sechs Kontrolllymphome, aber in keinem der 17 *INK4a/ARF*null-Tumore gefunden. Um nach einem möglichen Gewinn des Chromosoms 14 in einer kleineren Subgruppe von

Tumorzellen zu suchen, welcher unterhalb der Detektionsgrenze der SKY- und CGH-Analysen liegt, wurden neun *ARF*null- und 14 *INK4a/ARF*null-Lymphome mit Hilfe von Interphase-FISH untersucht. Die Signale einer Chromosom 14 spezifischen „Painting“-Sonde wurden dafür in mindestens 200 Zellkernen pro Lymphom ausgezählt. Das Ergebnis der Untersuchung entsprach den Resultaten der SKY- und CGH-Analysen; es wurde kein Gewinn des Chromosoms 14 nachgewiesen, auch nicht in einer kleinen Zellpopulation. Der reguläre Chromosom 14-Status der *INK4a/ARF*null-Lymphome wurde somit bestätigt. Abbildung 4.1.3 veranschaulicht das Ergebnis dieser Untersuchung.

Auf die Tumorlatenz hatte der Chromosom 14 Status innerhalb der *ARF*null-Gruppe keinen signifikanten Einfluß, wie aus Tabelle 4.1 hervorgeht.

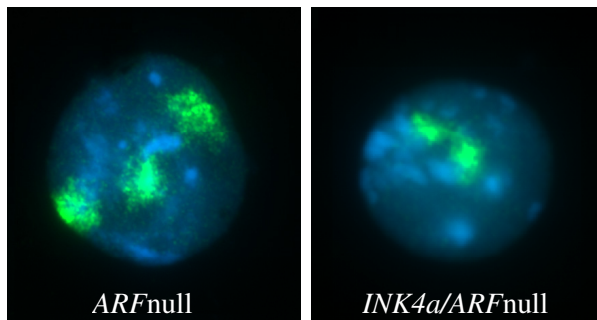


Abbildung 4.1.3 Prüfung des Chromosom 14-Status der Lymphome mittels Interphase-FISH. Die Signale einer Chromosom 14 spezifischen „Painting“-Probe (FITC, grün) wurden an DAPI-gefärbten Zellkernen ausgewertet. In *ARF*null-Lymphomen wurden häufig drei Signale (hier ein Zellkern aus Fall A9), in allen untersuchten *INK4a/ARF*null-Lymphomen jeweils zwei Signale pro Zelle (hier IA8) gezählt.

Die am häufigsten beobachtete Alteration in allen drei Lymphomgruppen war der Gewinn des kompletten Chromosoms 3, welcher in fünf der sechs Kontrolltumore, in 10 der 15 *ARF*null-Lymphome und in sieben der 17 *INK4a/ARF*null-Lymphome detektiert wurde.

Auch der Zugewinn von Chromosom 18 war ein häufiges Ereignis in allen drei Lymphomgruppen. Er wurde in vier von sechs Kontroll-, vier von 15 *ARF*null- und fünf von 17 *INK4a/ARF*null-Lymphomen gefunden. In der Mehrzahl der Tumore war der Gewinn des Chromosoms 18 von einer zusätzlichen Kopie des Chromosoms 3 begleitet.

Der Gewinn des Chromosoms 6 war ein wiederholtes Ereignis in *ARF*null- (zwei von 15) und *INK4a/ARF*null-Lymphomen (zwei von 17), welches mit vergleichbarer Häufigkeit in Kontrolllymphomen (eins von sechs) beobachtet wurde.

Weitere rekurrente Aberrationen in *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Tumoren, die jedoch nicht in Kontrolllymphomen gefunden wurden, waren der Gewinn des Chromosoms 1 sowie ein Gewinn der Region 5E5/F-5G. In den sechs Lymphomen mit einem Gewinn 5E5/F-5G (zwei *ARF*null- und vier *INK4a/ARF*null-Tumore) resultierte dieser aus einer Translokation an der chromosomalen Bandenposition 5E5 bis 5F mit den verschiedenen Partnerchromosomen 2, 4 und 17 oder aus einem zusätzlichen deletierten Chromosom 5. In Abbildung 4.1.1 (B) ist als Beispiel Fall A12 mit einer Translokation T(2;5) zu sehen.

Um zu prüfen, ob die rekurrenten Aberrationen einen weiteren Anstieg der *c-myc*-Gendosis zur Folge hatten, wurde die Insertionsstelle des *c-myc*-Transgens im Genom der Mäuse bestimmt. Dafür wurde der BAC RP23-307D14, welcher das murine *c-myc*-Gen trägt, mittels FISH auf Metaphasen einer nichtmalignen *c-myc*-transgenen Kontroll-Maus ohne *INK4a/ARF*-Mutation analysiert. Die Co-Hybridisierung Chromosomen-spezifischer „Painting“-Sonden diente der sicheren Identifizierung der Insertionsstelle. Wie in

Abbildung 4.1.4 dargestellt, wurde das endogene *c-myc*-Gen auf beiden Kopien des Chromosoms 15 und das Transgen als etwas schwächeres Signal in der Bande C1 eines Chromosoms 19 detektiert. Da alle in dieser Arbeit untersuchten Tiere ihren Ursprung in demselben *Eu-myc*-transgenen Gründerstamm haben, sollte das Ergebnis dieses Experiments auf alle Mäuse der Studie übertragbar sein. Dies wurde anhand von FISH-Experimenten mit der Sonde RP23-307D14 auf Metaphasen der Tumore C4 und C10 bestätigt. In Zellen von Wildtyp-Mäusen dagegen wurden nur Signale auf den Chromosomen 15 gefunden.

Durch die Lokalisierung des *c-myc*-Transgens in der Bande 19C1 wurde die Möglichkeit ausgeschlossen, daß die beobachteten rekurrenten Aberrationen der Lymphome ursächlich auf die Position des Transgens zurückzuführen sind.

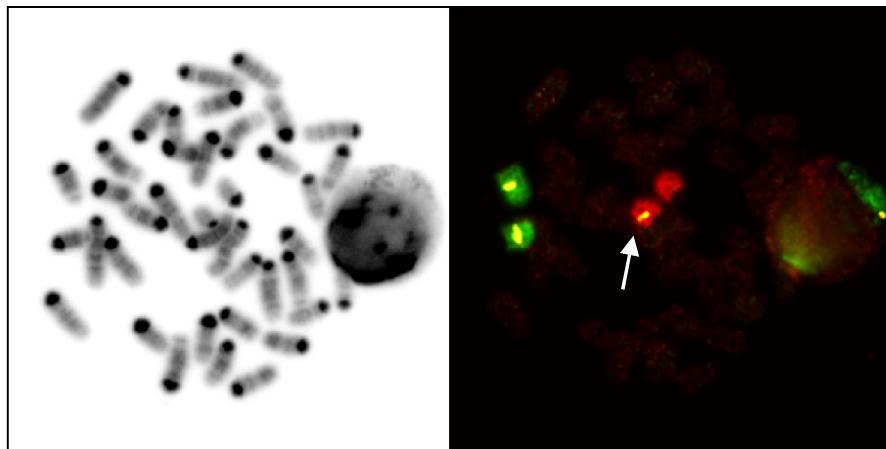


Abbildung 4.1.4 Ermittlung der Insertionsstelle des *c-myc*-Transgens mittels FISH. Der das *c-myc*-Protoonkogen enthaltende BAC RP23-307D14 (Cy5, gelb) wurde auf Metaphasen nicht-maligner *Eu-myc*-transgener Lymphozyten hybridisiert. „Painting“-Proben erleichterten die Identifizierung der beiden Chromosomen 15 (FITC, grün), welche aufgrund des endogenen Locus jeweils ein *c-myc*-Signal aufwiesen, sowie der Chromosomen 19 (Tamra, rot), von denen eines der beiden Homologen ein gelbes Signal (Pfeil) trug, hervorgerufen durch die Insertion des Transgens.

Während wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ein Teil des primären Lymphommaterials für die zytogenetischen Analysen verwendet wurde, wurde von Dr. Clemens Schmitt ein weiterer Teil in bis zu drei Empfänger-mäuse transplantiert. In diesen bildeten sich erneut Lymphome. Die tumortragenden Tiere wurden durch Verabreichen von Cyclophosphamid (CTX) therapeutisch behandelt. Der folgende Abschnitt bezieht sich auf den Vergleich der Chromosomenaberrationen der Primärlymphome mit den von Schmitt *et al.* erhobenen Therapiedaten der transplantierten Tumore. Tabelle 4.1 stellt eine kombinierte Übersicht der Ergebnisse dar.

Dem Beispiel von Schmitt *et al.*, 1999 folgend, wurden die Therapieergebnisse verschiedener Transplantationstumore eines primären Tumors, soweit verfügbar, als separate Daten betrachtet.

Die Verabreichung des Antitumor-Medikaments CTX an Lymphom-tragende Mäuse erbrachte zunächst für fast alle Tumore (36/37) eine völlige Remission. Innerhalb der Beobachtungsdauer von 100 Tagen nach Therapie wurden die Lymphknoten der Mäuse von Schmitt *et al.* durch Tasten untersucht. In diesem Zeitraum entwickelten 26 der 37 Tiere ein Rezidiv-Lymphom. Abbildung 4.1.5 veranschaulicht die Remissionszeiten in den verschiedenen Lymphomgruppen. Von den fünf Kontrolllymphom-tragenden Mäusen waren zwei Tiere noch nach 100 Tagen tumorfrei. Ebenso blieb die Hälfte der Mäuse mit *ARF*null-Lymphomen (acht von 15) in Remission. Mäuse mit *INK4a/ARF*null-Lymphomen wiesen dagegen deutlich schlechtere Behandlungserfolge auf. Schon nach 20 Tagen entwickelten über 50% der Tiere dieser Gruppe (zehn von 17) einen Rezidiv-Tumor.

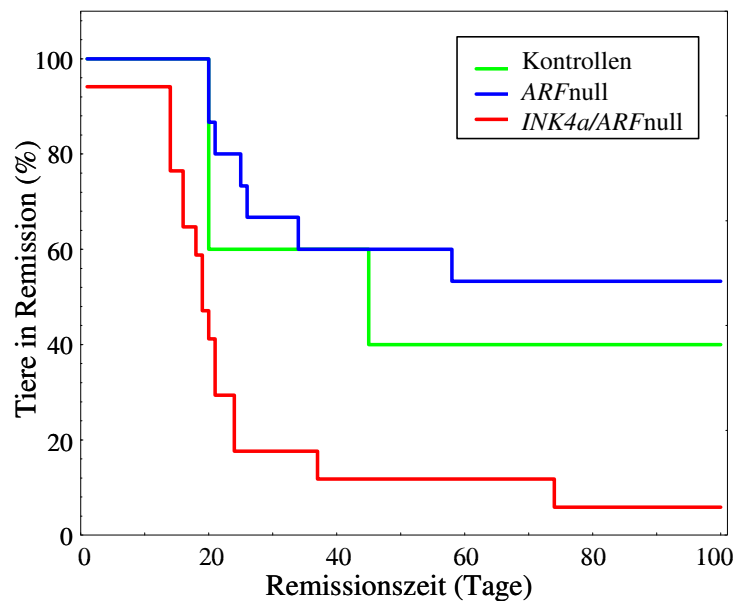


Abbildung 4.1.5 Tumor-freies Überleben der Mäuse mit Kontroll- (grün, n = 5), *ARF*null- (blau, n = 15) und *INK4a/ARF*null-Lymphomen (rot, n = 17) als Folge der CTX-Therapie. Mäuse mit *INK4a/ARF*null-Tumoren erzielten deutlich schlechtere Behandlungserfolge als Kontroll- oder *ARF*null-Lymphome.

Ein Ziel der Arbeit bestand darin, nach therapielevanten Subklassifizierungen der Tumore mit bekanntem *INK4a/ARF*-Status zu suchen. Die Gruppe der Kontrolllymphome war mit nur fünf Tieren zu klein, um daran Unterteilungen, basierend auf chromosomalen Aberrationen, vorzunehmen. Deshalb konzentrierten wir die Analysen auf *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Lymphome.

Zunächst untersuchten wir einen möglichen Einfluß des Gewinns von Chromosom 14, welcher in *ARF*null-Lymphomen häufig war und in *INK4a/ARF*null-Lymphomen nicht gefunden wurde, auf den Erfolg der CTX-Behandlung. Die Mehrheit der *ARF*null-Lymphome mit Gewinn des Chromosoms 14 (sechs von acht) war noch nach 100 Tagen in Remission. Von den sieben *ARF*null-Lymphomen ohne einen Gewinn des Chromosoms 14 blieben dagegen nur zwei tumorfrei. Damit ähnelt der Therapieverlauf dieser Tumore denen der *INK4a/ARF*null-Gruppe. Abbildung 4.1.6 stellt die Remissionszeiten der

*ARF*null-Lymphome mit und ohne Gewinn des Chromosoms 14, sowie der *INK4a/ARF*null-Lymphome, alle ohne einen Gewinn des Chromosoms 14, graphisch dar. Der Unterschied innerhalb der *ARF*null-Gruppe in Abhängigkeit des Chromosom 14-Status war signifikant (Mann-Whitney U-Test, $P = 0,044$).

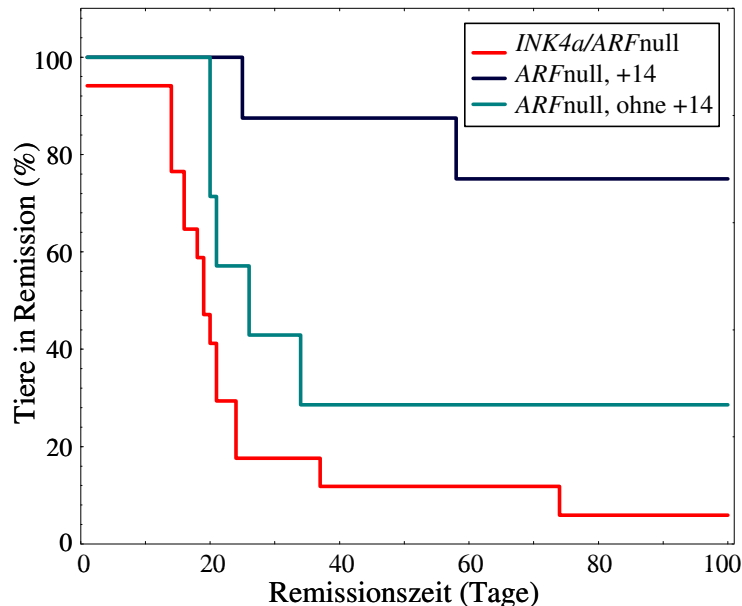


Abbildung 4.1.6 Tumor-freies Überleben als Folge der CTX-Therapie in Abhängigkeit des *INK4a/ARF*- und des Chromosom 14-Status der primären Tumore. Der Graph der *ARF*null-Lymphome mit Gewinn des Chromosoms 14 ($n = 8$) ist dunkelblau, der *ARF*null-Lymphome ohne Gewinn des Chromosoms 14 ($n = 7$) ist hellblau, und der *INK4a/ARF*null-Lymphome ($n = 17$; alle ohne Chromosom 14-Gewinn) ist rot dargestellt. *ARF*null-Tumore mit Gewinn des Chromosoms 14 sind mit einem deutlich besseren Therapieverlauf verbunden als die Tumore ohne Chromosom 14-Gewinn.

Im folgenden wurde der Gewinn des Chromosoms 6, welcher sowohl in *ARF*null- (in zwei von 15 Fällen) als auch in *INK4a/ARF*null-Lymphomen (in zwei von 17 Fällen) als rekurrente Aberration auftrat, mit den Remissionszeiten der transplantierten Tumore verglichen. Die nach *INK4a/ARF*null- und Chromosom 6-Status aufgetrennte Betrachtung der Therapieergebnisse ist in Abbildung 4.1.7 dargestellt. Innerhalb der *INK4a/ARF*null-Gruppe hatte der Gewinn des Chromosoms 6 keinen signifikanten Einfluß auf die Remissionszeiten ($P = 0,426$). Dagegen korrelierte der Gewinn des Chromosoms 6 in *ARF*null-Lymphomen mit einem signifikant schlechteren Therapieverlauf ($P = 0,019$). *ARF*null-Lymphome mit einem Gewinn von Chromosom 6 phänotypierten geradezu die schlechten Behandlungsergebnisse der *INK4a/ARF*null-Lymphome.

Hierbei muß beachtet werden, daß ein Gewinn des Chromosoms 6 in allen Lymphomen mit einem regulären Chromosom 14-Status einherging, welcher innerhalb der *ARF*null-Gruppe mit einer schlechten Prognose korrelierte. Um zu prüfen, inwieweit der Chromosom 6-Gewinn als eigenständiger prognostischer Marker fungiert, beschränkten wir den Vergleich der Therapieergebnisse auf die sieben *ARF*null-Lymphome mit regulärem Chromosom 14-Status. Innerhalb dieser Gruppe entwickelten alle vier Mäuse

mit Lymphomen mit Chromosom 6-Gewinn und nur eines der drei Tiere mit Lymphomen ohne Gewinn des Chromosoms 6 nach 35 Tagen ein Rezidiv. Die beiden anderen Mäuse blieben während der gesamten Beobachtungszeit tumorfrei. Trotz der geringen Anzahl der vier versus drei Fälle schlußfolgerten wir aus diesem Ergebnis, daß der Chromosom 6-Status in *ARF*null-Tumoren einen eigenständigen prognostischen Marker bildet.

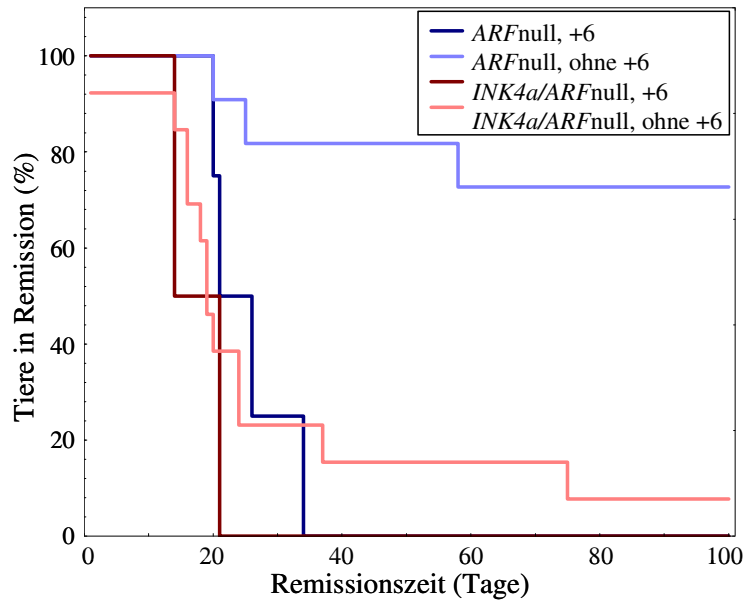


Abbildung 4.1.7 Tumor-freies Überleben als Folge der CTX-Therapie in Abhängigkeit des *INK4a/ARF*- und des Chromosom 6-Status der primären Tumore. Verglichen wurden die Remissionszeiten von *ARF*null-Lymphomen mit (hellblau, n = 4) und ohne (dunkelblau, n = 11) Gewinn des Chromosoms 6. *ARF*null-Tumore mit Chromosom 6-Gewinn bildeten, ebenso wie die *INK4a/ARF*null-Tumore, frühzeitig Rezidivtumore, wodurch sie sich signifikant von *ARF*null-Tumoren ohne Chromosom 6-Gewinn unterschieden.

Die häufigste zytogenetische Alteration in *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Lymphomen war der Gewinn des Chromosoms 3. Dieser war in fast allen therapeutisch untersuchten *ARF*null-Tumoren von einem Gewinn des Chromosoms 14 begleitet (sieben der acht Fälle mit Chromosom 3-Gewinn). Demnach war die Subgruppe der *ARF*null-Lymphome mit Gewinn des Chromosoms 3 und ohne Zugewinn von Chromosom 14 zu gering für vergleichende Untersuchungen.

Auch die Fallzahlen der *ARF*null-Lymphome mit den rekurrenten Aberrationen Gewinn der Chromosomen 1 und 18, sowie die Translokationen an 5E5/F waren, insbesondere nach Auftrennung der Tumore hinsichtlich ihres Chromosom 6 und 14-Status, nicht ausreichend, um den Einfluß dieser Aberrationen auf den Erfolg der CTX-Therapie zu untersuchen.

Die Gruppe der *INK4a/ARF*null-Lymphome andererseits wies sehr einheitliche Therapieverläufe auf. Fast alle Mäuse (15 von 17) bildeten schnelle Rezidivtumore in weniger als 40 Tagen. Somit konnte keine rekurrente Aberration beschrieben werden,

welche als Marker für die Effizienz antitumorigener Behandlung von *INK4a/ARF*-null-Lymphomen durch CTX genutzt werden könnte.

4.2 Die CFS-Expression in der murinen Translokationsbruchregion 5E5/F

Wie bereits in Kapitel 1.3.1 beschrieben, ist die Annahme weitverbreitet, wonach spezielle instabile DNA-Abschnitte, sogenannte CFSs, bei der Bildung chromosomaler Umbauten in der Tumorentwicklung eine Rolle spielen. Ein Translokationsbruchpunkt, der in den untersuchten Lymphomen als rekurrentes Ereignis beobachtet wurde, befand sich an der zytogenetischen Bandenposition 5E5/F. Unser Ziel war es nun, den Bruchpunkt genauer zu definieren und zu prüfen, ob dieser in ein CFS kartiert. Dafür wurden verschiedene BAC-DNAs der Region 5E5/F einerseits auf Metaphasen von Lymphomen mit einer Translokation des Chromosoms 5, als auch auf APC-behandelte Chromosomen von Wildtyp-Mäusen hybridisiert. Die DNA-Sonden von BAC RP23-26M9 bis RP23-102F1 überspannen insgesamt 10 Mb genomische Sequenz der Maus. In diesem Abschnitt lokalisieren sechs Synteniebruchpunkte zum menschlichen Genom, welche Bereiche mit Homologien zu den humanen Chromosomen 1, 4, 8, 12 und 22 voneinander abgrenzen (siehe Abbildung 4.6.1). Der Translokationsbruchpunkt kartierte in den vier analysierten Tumoren A1, A10, IA11 und C1 jeweils telomerisch außerhalb des BAC-Kontigs. Die Mehrheit der APC-induzierten CFSs (neun von 14) wurde zentromerisch außerhalb unseres Kontigs beobachtet. Drei CFSs kartierten innerhalb der 10 Mb-Region und zwei weitere telomerisch außerhalb.

4.3 Zytogenetische Kartierung von Maus-CFSs

Die Basis der folgenden Untersuchungen bildete die Kartierung der Maus-CFSs, deren Expression durch die verschiedenen APC-Konzentrationen 0,2 μ M und 0,4 μ M in stimulierten B- und T-Lymphozyten der Mausstämme BALB/c (drei weibliche, zwei männliche Tiere) und C57BL/6 (zwei weibliche, drei männliche Tiere) induziert wurde. Zur Analyse spontaner Läsionen wurde pro Maus jeweils ein Teil der Zellen in APC-freiem Medium kultiviert. Um eine sichere Identifizierung der mitunter stark beschädigten oder rearrangierten Chromosomen oder Chromosomenstücke zu gewährleisten, wurden an APC-behandelten Zellen SKY-Analysen durchgeführt. Pro Maus und APC-Konzentration wurden etwa 25 komplette Chromosomensätze ausgewertet. Sämtliche APC-induzierten oder spontanen Chromatidlücken, Brüche und Translokationen wurden mit ihren jeweiligen Häufigkeiten der zytogenetischen Position ihres Auftretens zugeordnet. Abbildung 4.3.1 stellt ein Beispiel für die Kartierung dar. Die vollständige Auflistung der Ergebnisse der zytogenetischen CFS-Kartierungsdaten wurde über die Internetseite der Klinischen Genetik der TU Dresden (<http://www.tu-dresden.de/medgen/>) veröffentlicht.

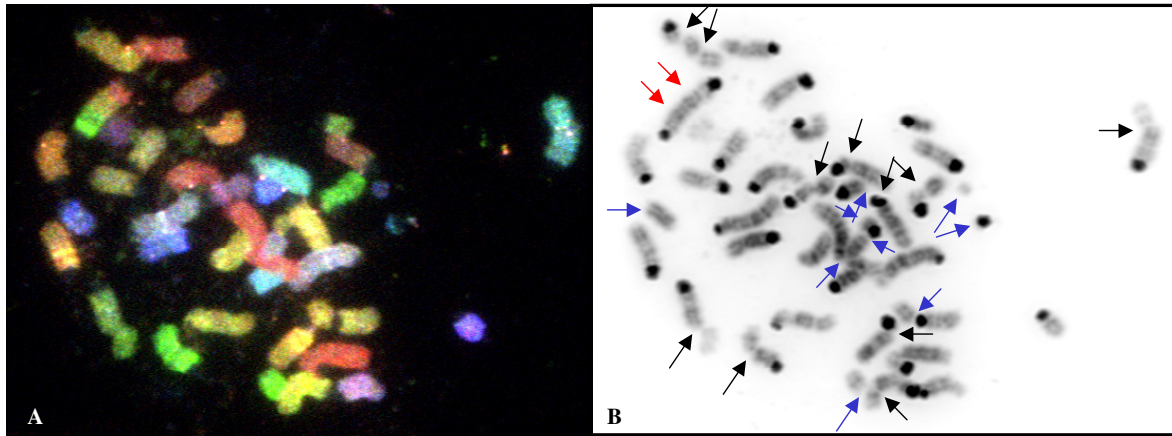


Abbildung 4.3.1 Beispiel für die CFS-Kartierung. Von APC-behandelten Maus-Lymphozyten wurden Metaphasen präpariert. Die SKY-Analyse (A) diente der Identifizierung der Chromosomen; CFSs wurden anhand des DAPI-Bildes (B) den zytogenetischen Banden zugeordnet. Diese stark rearrangierte Beispielmetaphase zeigt Chromatinlücken (schwarze Pfeile) in 3B, 3F3, 4B1, 4C6, 5G1, 6A1, 8C1, 12C1, 13C2, 14A2 und 16C1, Chromosomenbrüche (blaue Pfeile) in 1D, 1H4, 6B1, 6D1, 8C1, 15A2, XA7.1 und XF1, sowie ein Translokationschromosom mit den Fusionsbanden 2C1.2, 6B1, 6D1 und 8C1 (rote Pfeile).

4.3.1 Die CFS-Expression der Mausstämmen BALB/c und C57BL/6

Die Mittelwerte der CFS-Anzahl pro Metaphase (genauer pro 40 Chromosomen), gebildet aus den Einzelwerten von jeweils fünf Tieren, wurden zwischen den Stämmen BALB/c und C57BL/6 verglichen. Chromatinlücken und Chromosomenbrüche (einschließlich Translokationen) wurden hierbei getrennt betrachtet. Abbildung 4.3.2 verdeutlicht die Ergebnisse des Vergleiches für die verschiedenen APC-Konzentrationen. Bereits die Kontrollmetaphasen exprimierten mit geringer Häufigkeit Lücken und Brüche ($0,2 \pm 0,1$ per Metaphase in BALB/c und $0,3 \pm 0,2$ in C57BL/6, Mittelwerte \pm Standardabweichung). Mit zunehmender APC-Konzentration stieg die CFS-Expression an und erreichte signifikant höhere Werte in BALB/c als in C57BL/6 Mäusen. Die statistische Auswertung mittels des Mann-Whitney U Tests ergab einen signifikanten Unterschied bei $0,2 \mu\text{M}$ APC für die Anzahl der Chromatinlücken (BALB/c: $3,8 \pm 1,7$ vs. C57BL/6: $1,5 \pm 1,3$) und bei $0,4 \mu\text{M}$ APC für die Anzahl der Chromosomenbrüche pro Metaphase (BALB/c: $2,6 \pm 0,6$ vs. C57BL/6: $1,6 \pm 0,5$) ($P < 0,05$). Während also die spontane Fragilität in beiden Mausstämmen in etwa gleich ausgeprägt war ($P = 0,531$), wiesen nach einer Induktion mit APC die Zellen des BALB/c Stammes höhere CFS-Häufigkeiten auf als die Zellen der C57BL/6 Mäuse. Signifikante Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Tieren wurden in keinem der Stämme und bei keiner APC-Konzentration beobachtet.

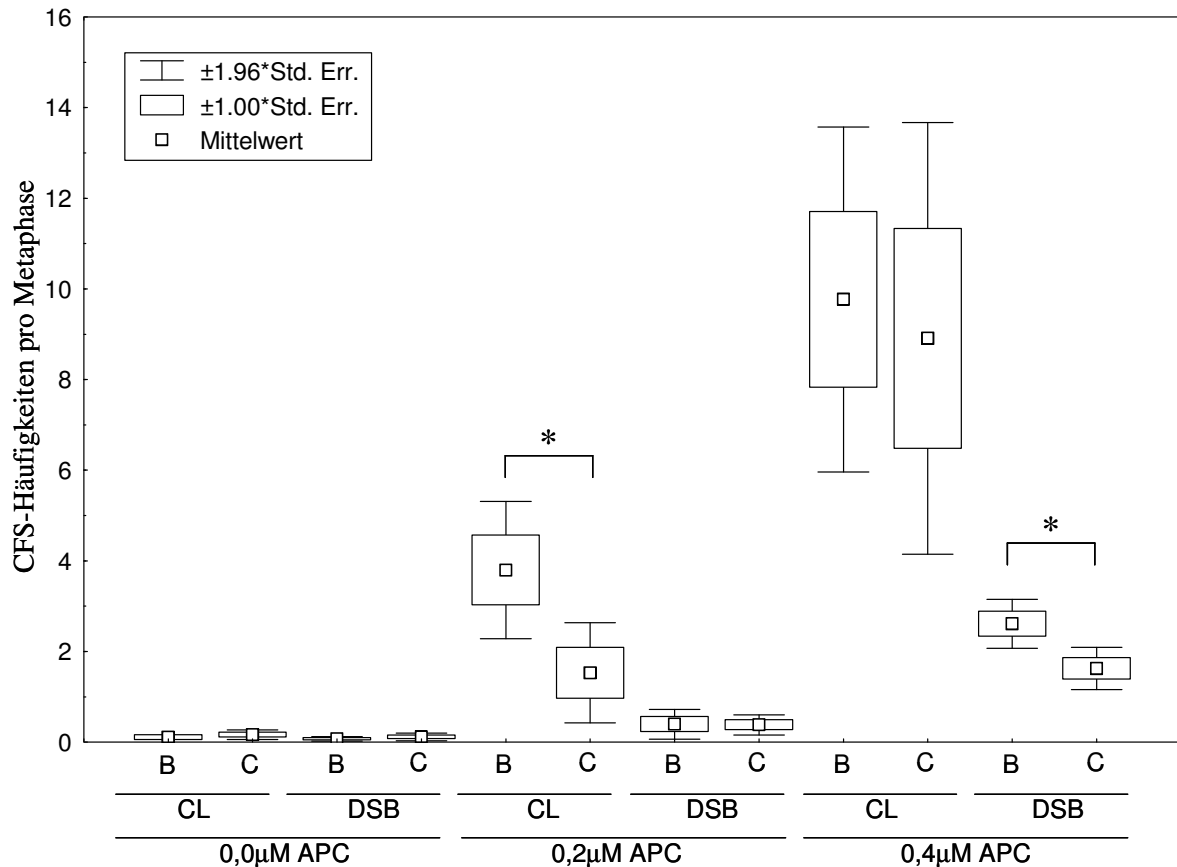


Abbildung 4.3.2 Häufigkeiten der Chromatinlücken (CL) und Doppelstrangbrüche (DSB) bei unterschiedlichen APC-Konzentrationen in den Mausstämmen BALB/c (B) und C57BL/6 (C). Angegeben sind jeweils die Mittelwerte $\pm 1,00$ und die 1,96 Standardfehler (Std. Err., standard error). Die Mittelwerte setzen sich aus aus den Einzelwerten von jeweils fünf Tieren zusammen und stellen die durchschnittliche Anzahl der CFSs pro Metaphase dar. Statistisch signifikante Unterschiede (Mann-Whitney U-Test; $P < 0,05$) zwischen den beiden Stämmen sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet.

Im Anschluß wurde untersucht, ob CFSs innerhalb beider Mausstämmen in jeweils den gleichen chromosomalen Banden auftraten oder ob CFS-exprimierende Banden stammspezifisch sind. Der Vergleich der CFS-Häufigkeiten an den 392 Bandenpositionen ergab, daß sich die relativen Expressionshäufigkeiten pro Bande zwischen beiden Stämmen nicht unterschieden. Abbildung 4.3.3 zeigt das Ergebnis der gekoppelten Korrelationsanalyse mittels des Spearman Tests. Der errechnete Korrelationskoeffizient R , ermittelt bei einer APC-Konzentration von 0,4 μM , beträgt 0,673 bzw. bei 0,2 μM APC 0,508. In beiden Fällen ist $P < 0,0001$. Somit liegt eine signifikante Übereinstimmung der relativen CFS-Häufigkeiten zwischen gleichen zygotenetischen Banden in den beiden analysierten Mausstämmen vor. Für alle nachfolgenden Analysen wurden die getrennt erhobenen Ergebnisse der beiden Stämme BALB/c und C57BL/6 deshalb nicht mehr separat betrachtet.

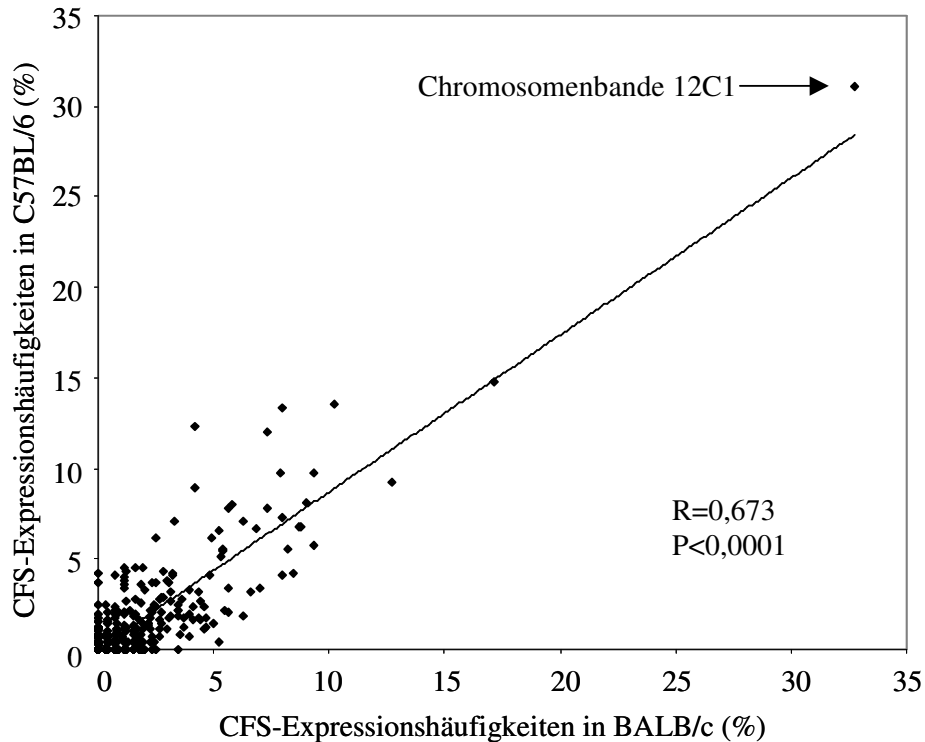


Abbildung 4.3.3 Vergleich der CFS-Expressionshäufigkeiten in allen 392 zytogenetischen Banden zwischen 0,4 μ M APC-behandelten BALB/c und C57BL/6 Zellen. Die Trendlinie ist in Richtung der X-Achse geneigt und macht somit deutlich, daß die Zellen der BALB/c-Mäuse eine höhere Gesamtexpression aufweisen als C57BL/6-Zellen (gepaarter Wilcoxon-Test, $P = 0,0002$). Der Spearman Test belegt dennoch eine starke Korrelation der relativen Expressionshäufigkeiten in den identischen Banden beider Stämme (R: Korrelationskoeffizient). Die chromosomale Bande 12C1 exprimiert in beiden Mausstämmen das häufigste CFS.

Durch Verwendung der zwei APC-Konzentrationen 0,2 μ M und 0,4 μ M im Kulturmedium wurden zwar CFSs verschieden häufig induziert, dennoch war das Verteilungsmuster der Expression über das gesamte Genom identisch. Der Vergleich der jeweiligen Banden für die beiden Konzentrationen im Spearman Test ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,731 und einen P-Wert von $P < 0,0001$.

In Zentromerbanden führte der Einfluß von APC - im Gegensatz zu nicht-Zentromerbanden - zu keinem signifikanten Anstieg der CFS-Expression. Abbildung 4.3.4 veranschaulicht die Verteilung der CFSs-Expression innerhalb von Zentromerbanden gegenüber nichtzentromerischen Banden für die verschiedenen APC-Konzentrationen. Zentromer- und nicht-Zentromerbanden wurden aufgrund dieses Ergebnisses in anschließenden Analysen getrennt voneinander betrachtet.

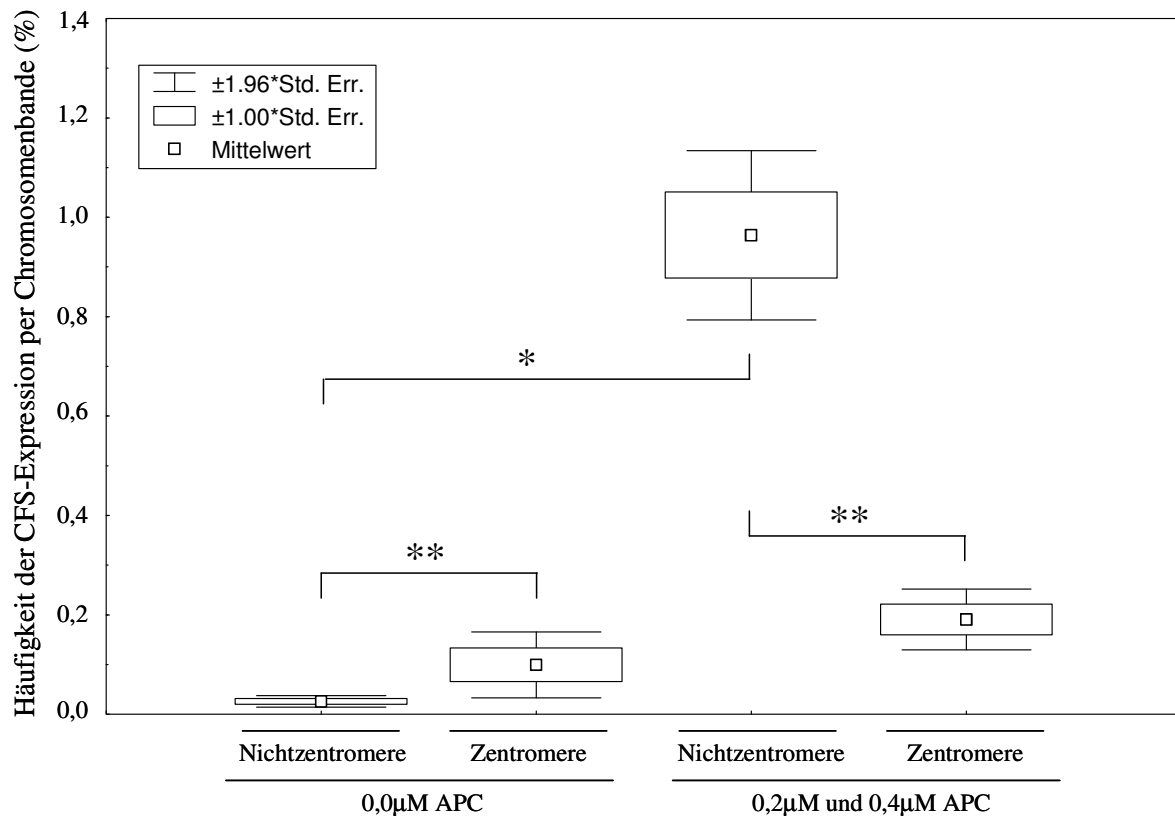


Abbildung 4.3.4 Häufigkeit der CFSs in Nichtzentromerbanden versus Zentromerbanden in Abhängigkeit der Induktion durch APC in Maus-Lymphozyten. Jede Bande wurde in 124 (Chromosom Y in der Kontrollgruppe) bis 1000 (Autosomen bei 0,2µM und 0,4µM APC) Chromosomen untersucht. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte $\pm 1,00$ und die 1,96 Standardfehler (Std. Err., standard error). Signifikante Unterschiede sind mit einem bzw. zwei Sternen gekennzeichnet (*: gepaarter Wilcoxon-Test $p < 0,05$; **: Mann-Whitney U Test $p < 0,05$). Durch APC-Zugabe wurde keine signifikante Zunahme der CFS-Expression in Zentromerbanden erreicht.

Im folgenden interessierte uns, ob die selten beobachteten spontanen Chromatinlücken und Doppelstrangbrüche bevorzugt in solchen Banden auftraten, die nach APC-Behandlung gehäuft CFS exprimierten. Für diese Untersuchung ermittelten wir zunächst aus der Gesamtheit der 392 Chromosomenbanden stabile und extrem fragile Stellen im Mausgenom. Die Berechnung basierte auf den Parametern der Sequenzlänge der jeweiligen Bande, entnommen aus der Datenbank Ensembl Genome Browser (Version Juli 2004) und deren beobachteter CFS-Expressionshäufigkeiten. In Tabelle 4.3.1 sind die errechneten stabilen, mittel fragilen und extrem fragilen Banden aufgelistet. Alle spontanen CFS-Ereignisse wurden anschließend entsprechend ihres Vorkommens den Banden in Tabelle 4.3.1 zugeordnet. Entsprechend den Ergebnissen aus dem vorherigen Absatz war die spontane Fragilität in Zentromerbanden relativ hoch, aber keine dieser 21 Banden wurde nach APC-Behandlung als extrem fragil eingestuft. Über ein Drittel der spontanen CFSs kartierte in extrem fragilen Nichtzentromerbanden, welche nur 12% der Gesamtbandenzahl stellen. Knapp die Hälfte der CFSs aus Kontrollmetaphasen traten in mittel fragilen nicht-Zentromerbanden auf. Keines der nichtzentromerischen CFSs aus Kontrollzellen wurde in stabilen Banden gefunden.

Tabelle 4.3.1 Unterteilung der Zentromer- und Nichtzentromerbanden nach der Häufigkeit ihrer APC-bedingten CFS-Expression und Zuordnung der spontanen Chromatinlücken (CL) und Doppelstrangbrüche (DSB). Stabile, mittel fragile und extrem fragile Banden wurden nach einem statistischen Verfahren unter Einbeziehung der CFS-Expressionsdaten aus beiden Mausstämmen und den APC-Konzentrationen 0,2 μ M und 0,4 μ M errechnet (siehe Kapitel 3.9). ¹Alle Banden bzw. ²nur die Banden mit spontanen Lücken/Brüchen pro Gruppe sind in der letzten Zeile aufgeführt. Banden mit spontanen CL und DSB sind fett hervorgehoben, die jeweiligen Gesamtzahlen der spontanen Ereignisse sind in Klammern gezeigt. Spontane Lücken/Brüche in unbehandelten Kontrollzellen traten vermehrt in chromosomalen Banden hoher APC-bedingter CFS-Expression auf.

	chromosomale Banden (n = 392)	Anzahl spontaner Lücken und Brüche (Gesamtzahl n = 58)
Zentromerbanden	a) stabil (n = 9)	5
	b) mittel fragil (n = 12)	5
	c) extrem fragil (n = 0)	0
Nicht-Zentromerbanden	d) stabil (n = 55)	0
	e) mittel fragil (n = 270)	26
	f) extrem fragil (n = 46)	22
a ¹ : 1A1, 2A1 (2CL), 3A1, 4A1, 7A1 (1CL), 11A1, 13A1 (1CL), 17A1, 18A1 (1DSB)		
b ¹ : 5A1, 6A1, 8A1.1 (2DSB), 9A1, 10A1, 12A1.1, 14A1 (1CL), 15A1, 16A1 (1CL+1DSB), 19A, XA1.1, YA1		
d ¹ : 1C1.1, 1C3, 1C5, 1E2.3, 1F, 1H2, 1H4, 2C3, 2E1, 2E3, 2H3, 3E3, 3H2, 4A3, 4C1, 4C3, 4C7, 4E1, 5A3, 5B2, 5E3, 5F, 6G1, 7C, 7D2, 7F2, 7F5, 8A3, 8D1, 9C, 9F2, 10B3, 10C2, 10C3, 11B2, 11C, 11E1, 11E2, 12A3, 12C3, 12F2, 13A5, 13B2, 14C1, 14D3, 15D1, 15D3, 15F1, 16B1, 16B5, 17C, 17E3, 19C1, 19D2, XA5		
e ² : 1B (1CL), 1D (1CL), 2H4 (1DSB), 3H3 (1CL), 3H4 (1DSB), 5G1 (1CL), 6A3 (4DSB), 6B3 (2CL), 6D1 (1CL), 6F2 (1CL), 7B1 (4DSB), 9D (1CL), 16A2 (2CL), 18A2 (1DSB), 18E4 (1DSB), 19B (3CL)		
f ¹ : 1A4, 1C2, 1E2.2 (1CL), 1E4, 1H5, 2C1.2, 2E4, 2F3, 3B, 3E2, 4B1 4C4 (1CL), 5C2, 5E4 (1CL), 6B1 (1CL), 6D3, 7B5, 7D1, 8A1.2, 8B2 (1DSB), 8C1, 8C3, 8E1 (1CL+1DSB), 9A4, 11A4, 12A1.2 (3CL+3DSB), 12C1 (1CL+1DSB), 12D1, 13A3.2, 13A4, 13C2, 14A2, 14E2.1, 14E3, 15A2 (4CL), 15B3.3, 16C1.1, 17B2 (1CL+1DSB), 17E1.3 (1CL), 18E1, XA1.3, XA3.2, XA4, XA7.1, XAF1, YC2		

4.3.2 Vergleich der CFS-Expression in Maus und Mensch

Labormausstämme wie BALB/c und C57BL/6 wurden durch fortlaufende Vermehrung innerhalb naher Verwandtschaftsgrade gezüchtet und zeichnen sich durch genomische Sequenzidentitäten von nahezu 100% aus. Ein Vergleich der Variationshöhe der CFS-Expression innerhalb eines Mausstammes und zwischen genetisch variablen Menschen soll Aufschluß darüber geben, ob interindividuelle Sequenzpolymorphismen einen möglichen Grund für variierende CFS-Expressionshäufigkeiten bilden. Als Maß für die Varianz wurden die CV-Werte (Variationskoeffizient, coefficient of variation) der CFS-Häufigkeiten für jede Bande bestimmt. Der CV-Wert stellt die normierte Standardabweichung in Prozent dar und errechnet sich als $100 \times \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$. Die CV-Werte der einzelnen Banden wurden anhand der CFS-Expressionsdaten von 5 BALB/c und 5 C57BL/6 Mäusen, sowie für zwei Gruppen mit jeweils 5 gesunden Probanden (Frauen und Männern, Daten von Karen Stout-Weider) bestimmt. Die CVs der Banden korrelierten zwischen den beiden menschlichen Gruppen

($R = 0,691$, $P < 0,0001$) und zwischen BALB/c und C57BL/6 ($R = 0,410$, $P < 0,0001$). Dieses Ergebnis bedeutet zum einen, daß die interindividuelle Varianz der CFS-Häufigkeit bandenspezifisch ist und zweitens, daß der hier angewandte Versuchsumfang für repräsentierbare Ergebnisse ausreicht. Die mittleren CV-Werte aus entweder der Gesamtheit der Banden, der Gesamtheit abzüglich der stabilen Banden oder ausschließlich der extrem stabilen Banden (siehe Tabelle 4.3.1 für die Maus; gleiche Berechnung für den Menschen) wurden zwischen den vier Gruppen verglichen. Wie in Tabelle 4.3.2 zu sehen ist, waren die mittleren humanen CVs stets geringer als die mittleren Maus-CVs. Daraus ergibt sich, daß Unterschiede in CFS-Expressionshäufigkeiten nicht durch interindividuelle Sequenzpolymorphismen zustande kommen.

Tabelle 4.3.2 Vergleich der mittleren CV-Werte der CFSs zwischen Labormausstämmen und Menschen. Die CFS-Expressionshäufigkeiten pro Chromosomenbande variierten stärker zwischen jeweils fünf Mäusen der Stämme BALB/c und C57BL/6 als zwischen zwei Gruppen von jeweils fünf Menschen.

Mittlerer CV-Wert aus:	BALB/c	C57BL/6	Menschen 1-5	Menschen 6-10
allen Banden	138,8	157,5	105,7	91,5
allen nicht stabilen Banden	133,0	153,3	81,8	69,1
extrem fragilen Banden	80,0	101,9	47,3	40,1

Wir beschrieben bereits die Übereinstimmung der relativen CFS-Expressionshäufigkeiten pro Chromosomenbande in BALB/c- und C57BL/6-Mausstämmen. Um nun eine evolutionäre Konservierung von CFSs zwischen Mäusen und Menschen zu analysieren, durchsuchten wir zunächst die Datenbanken nach großen syntenischen Regionen, welche mindestens zwei zytogenetische Banden ohne Bruchpunkt zwischen den beiden Genomen überspannen. Zwischen Maus und Mensch fanden wir 17 syntenische Segmente, die zusammen 77 Chromosomenbanden umfaßten. Homologe Chromosomenbanden entsprachen sich in ihrer Giemsa-positiven bzw. -negativen Färbung. Die mittleren CFS-Expressionshäufigkeiten jeder der 77 homologen Banden des Mausgenoms (ermittelt in $0,4 \mu\text{M}$ APC-behandelten Lymphozyten von jeweils fünf Tieren der Stämme BALB/c und C57BL/6) wurden den mittleren Häufigkeiten ihrer korrespondierenden humanen Banden (gewonnen aus der Analyse von $0,4 \mu\text{M}$ APC-behandelten Lymphozyten von 10 Probanden, humane CFS-Kartierung von Karen Stout-Weider) gegenübergestellt. Abbildung 4.3.5 veranschaulicht diesen Vergleich. Unter Verwendung des Spearman Tests errechneten wir den Korrelationskoeffizienten $R = 0,538$ und den P-Wert $P < 0,0001$. Die beiden Werte beschreiben die Korrelation der CFS-Expressionshäufigkeiten zwischen homologen murinen und humanen Chromosomenbanden als klar signifikant. Ebenso zeigte die gleiche Berechnung, ohne daß die besonders fragilen Banden (siehe Tabelle 4.3.1) einbezogen wurden, eine signifikante Korrelation in der Häufigkeit ihrer CFS-Expression für die verbleibenden Banden auf ($R = 0,402$, $P < 0,001$). Zur Kontrolle ermittelten wir die P-Werte für eine Korrelation nach randomisierter Zuordnung der CFS-Häufigkeiten in den syntenischen Regionen. In diesem Kontrollexperiment erhielten wir keine signifikante Korrelation ($R = 0,069$, $P = 0,553$; $R = 0,059$, $P = 0,608$). Die Signifikanz der evolutionär konservierten CFS-Häufigkeiten zwischen homologen Banden ist damit bestätigt.

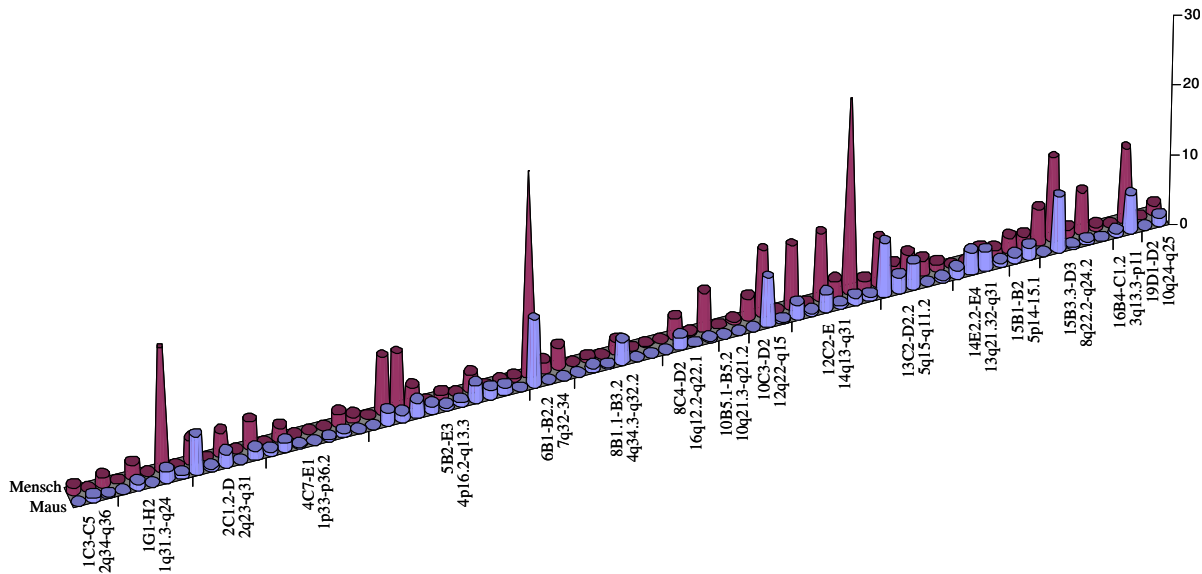


Abbildung 4.3.5 Gegenüberstellung der CFS-Expressionshäufigkeiten zwischen den syntenischen Regionen von Mensch und Maus. Jeder Zylinder stellt die Meßwerte für eine chromosomale Bande dar. Gegenüberstehende Zylinder entsprechen homologen Banden; die jeweiligen murinen und humanen Banden sind auf der X-Achse angegeben. Synthenieblöcke sind durch schwarze Trennlinien voneinander abgegrenzt. Die Y-Achse symbolisiert die Höhe der CFS-Expression für jede Bande in %. Zwischen den CFS-Expressionshäufigkeiten der jeweiligen homologen Banden wurde eine starke Korrelation errechnet.

4.4 Das menschliche CFS FRA7K

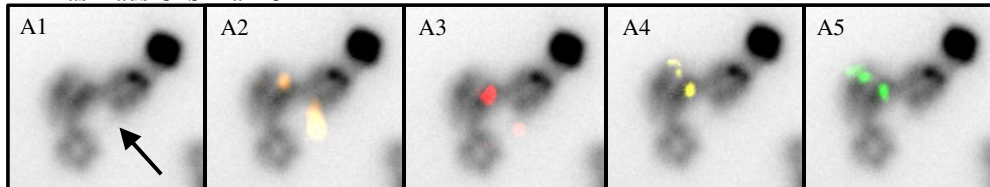
4.4.1 Molekular-zytogenetische Charakterisierung des murinen Fra12C1 und seines humanen Homologs FRA7K

Um die CFS-Konservierung detailliert untersuchen zu können und um nachfolgend Analysen zur Aufklärung des molekularen Mechanismus der CFS-Expression durchzuführen, war die Auffindung der genauen CFS-Regionen zwingend notwendig. Zur Kartierung des häufigsten Maus-CFSs, 12C1, hybridisierten wir BACs auf Metaphasen APC-behandelter Zellen. Die Positionen der Sonden relativ zu allen beobachteten Läsionen in 12C1 wurden notiert. Zeigte ein BAC Signale sowohl am zentromerischen, als auch am telomerischen Rand der Chromatinlücke, so folgerten wir, daß der BAC das CFS überspannte (siehe Abbildung 4.4.1). Anhand der FISH-Experimente gelang es uns, Fra12C1 molekular-zytogenetisch zu definieren (siehe Abbildung 4.4.2). Die distale Grenze des CFS befindet sich zwischen den BACs RP23-153D4 und RP23-146M5; die proximale Grenze kartiert zentromerisch zum proximalsten Klon unseres Kontigs, RP23-75F23.

Im folgenden analysierten wir die homologen menschlichen Sequenzen zu Fra12C1 hinsichtlich ihrer CFS-Expression. Die BACs der homologen Bereiche kartierten in die Bande q31.1 des humanen Chromosoms 7. Sie wurden auf APC-behandelte Lymphozyten-Metaphasen zweier normaler Menschen hybridisiert. Die Lokalisation der FISH-Signale (jeweils proximal, distal oder über das CFS gespalten) wurde für jede Chromatinlücke und jeden Doppelstrangbruch innerhalb der Bande 7q31 notiert (Abbildung 4.4.2). Dabei wurde deutlich, daß die homologen Sequenzen des Maus-CFSs Fra12C1 im menschlichen Genom ebenso ein CFS exprimieren. Die vom CFS überspannte genomische Sequenz liegt zwischen den BACs RP11-413B2 und RP11-706F7.

Für das humane Chromosom 7 sind bereits zehn andere CFSs, basierend auf zytogenetischen und molekular-zytogenetischen Untersuchungen, als FRA7A bis FRA7J beschrieben (<http://gdb.weizmann.ac.il/gdb-bin/genera/genera/hgd/FragileSite>). Wir nannten deshalb unser neu charakterisiertes CFS FRA7K.

A – Das Maus-CFS Fra12C1



B – Das menschliche CFS FRA7K

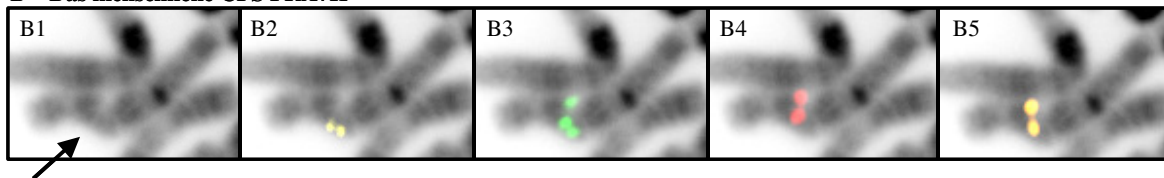


Abbildung 4.4.1 Beispiel zur FISH-Kartierung von Fra12C1 und FRA7K. In A1 und B1 sind jeweils eine DAPI-gefärbte partielle Metaphase mit CFSs in der Maus-Chromosomenbande 12C1 bzw. in 7q31 des Menschen gezeigt. Die FISH-Analyse der selben Chromosomen ist in A2-5 bzw. in B2-5 zu sehen. Dabei sind die Fluoreszenzen von Cy5 in orange, von Tamra in rot, von DEAC in gelb und von FITC in grün dargestellt. Fra12C1 (A): Die BACs RP23-75F23 in orange (A2) und RP23-36P23 in rot (A3) kartieren proximal, die BACs RP23-370D5 in gelb (A4) und RP23-153D4 in grün (A5) kartieren distal zum CFS. Fra12C1 wird damit in diesem Beispiel innerhalb der Region zwischen den beiden BACs RP23-36P23 und RP23-370D5 exprimiert. FRA7K (B): Der BAC RP11-75O20 in gelb gibt Signale proximal (B2), und die BACs RP11-297O14 in rot (B4) und RP11-706F7 in orange (B5) distal zum CFS. RP11-413B2 in grün (B3) gibt Signale auf beiden Seiten des CFSs, was bedeutet, daß das CFS innerhalb der Region dieses BACs liegt. Beide CFSs, das Fra12C1 der Maus und das FRA7K des Menschen, wurden auf diese Weise molekular-zytogenetisch kartiert.

In Abbildung 4.4.2(C) sind die Kartierungsergebnisse für Fra12C1 und FRA7K nach dem Vorbild aus der Literatur aufgeführt. Dabei wird für jeden BAC die Anzahl der beobachteten Lokalisierungen zentromerisch, telomerisch oder über das CFS gespalten angegeben. Durch die gleichzeitige Hybridisierung mehrerer BAC-DNAs war es uns darüber hinaus möglich, die Mehrzahl der Chromatinlücken und Doppelstrangbrüche auf Regionen entweder in einem BAC oder zwischen zwei BACs einzugrenzen. Abbildung 4.4.2(D) stellt die graphische Darstellung dieses Ergebnisses dar.

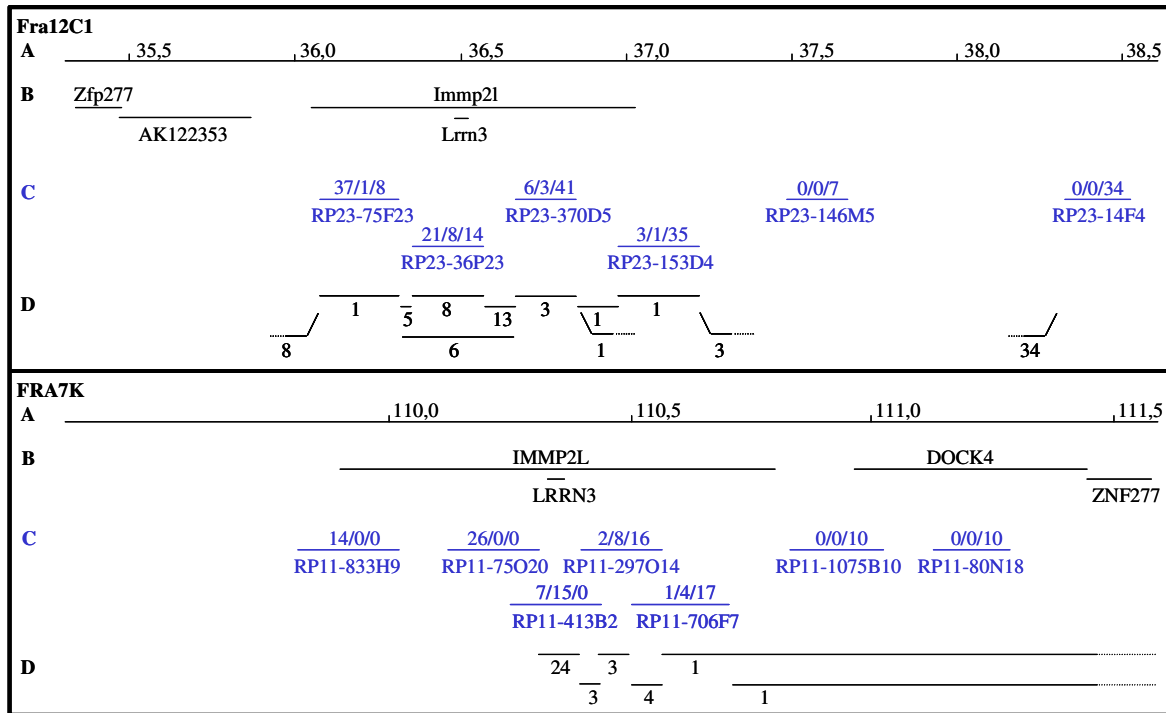


Abbildung 4.4.2 FISH-Ergebnisse für die genaue Lokalisierung des murinen Fra12C1 und sein humanes Homolog FRA7K. (A) Basenposition auf den Chromosomen 12 der Maus und 7 des Menschen [Mb], (B) bekannte Gene in diesen Regionen, (C) die hybridisierten Klone mit ihren FISH-Lokalisationen relativ zu allen 84 beobachteten CFSs in der Bande 12C1 der Maus bzw. zu allen 36 CFSs in Bande 7q31 (Anzahl der Hybridisierungssignale zentromerisch / auf beiden Seiten / telomerisch zur Chromatinlücke), (D) die Anzahl der von uns analysierten CFSs mit ihren relativen Positionen entweder innerhalb eines BACs, zwischen zwei gemeinsam hybridisierten BACs oder ohne definierte Eingrenzung. Das häufigste CFS der Maus, Fra12C1, entspricht dem humanen CFS FRA7K.

Aus der Literatur ist bereits ein anderes CFS, FRA7G, in Bande 7q31 bekannt, welches telomerisch von FRA7K kartiert (Huang *et al.*, 1998a; Hellman *et al.*, 2002). Nach unseren Resultaten lagen die Chromatinlücken bzw. die Brüche in 7q31 in 36 untersuchten CFSs 34 mal innerhalb des FRA7K-überspannenden BAC-Kontigs und zweimal telomerisch zum jeweils am meisten distal gelegenen BAC des Kontigs (einmal 297O14 und einmal 706F7).

4.4.2 Analyse der Bruchpunkte und CFSs auf Chromosom 7, insbesondere in 7q31

CFSs gelten als genomische Regionen, in denen besonders häufig Bruchpunkte in einer Vielzahl von Tumoren auftreten (siehe Kapitel 1.3.1). Auf der Internetseite www.chr7.org sind eine Reihe von Daten über das Chromosom 7 hinterlegt, u.a. Sequenzdaten und eine detaillierte Übersicht über Bruchpunktkartierungen in malignen und nicht-malignen Erkrankungen. Mit Hilfe dieser Informationen fertigten wir einen Vergleich der Häufigkeiten bisher bekannter Chromosomenbruchpunkte und der Expression von CFSs für das Chromosom 7 an. Insgesamt wurden 3780 Bruchereignisse, davon 1961 aus nicht-malignen und 1819 aus malignen Erkrankungen, ausgewertet. Der jeweilige Anteil an der Gesamtheit der Brüche bzw. CFSs des Chromosoms 7 wurde für jede Bande errechnet und in Abbildung 4.4.3(A) dargestellt. Die beiden Bruchpunktverteilungen stimmen weitgehend überein, der Korrelationskoeffizient R des Spearman Testes betrug 0,711 und der P -Wert für eine bestehende Korrelation belief sich auf $P < 0,005$. Der Vergleich der CFSs mit den Bruchpunkten ergab keine signifikante Korrelation ($R = 0,479$ und $P = 0,061$ für die nicht-malignen; $R = 0,326$ und $P = 0,218$ für die malignen Bruchpunkte). Um eine gewebsabhängige Variation des CFS-Expressionsmusters als mögliche Fehlerquelle bei der Beurteilung auszuschließen, beschränkten wir dann die vergleichende Analyse der in Lymphozyten erhobenen CFS-Daten auf die 1308 Bruchpunkte aus Zellen lymphoblastoider Tumore. Auch in diesem Vergleich wurde keine signifikante Korrelation zwischen der Häufigkeit von CFSs und Tumorbruchpunkten gefunden ($P = 0,158$).

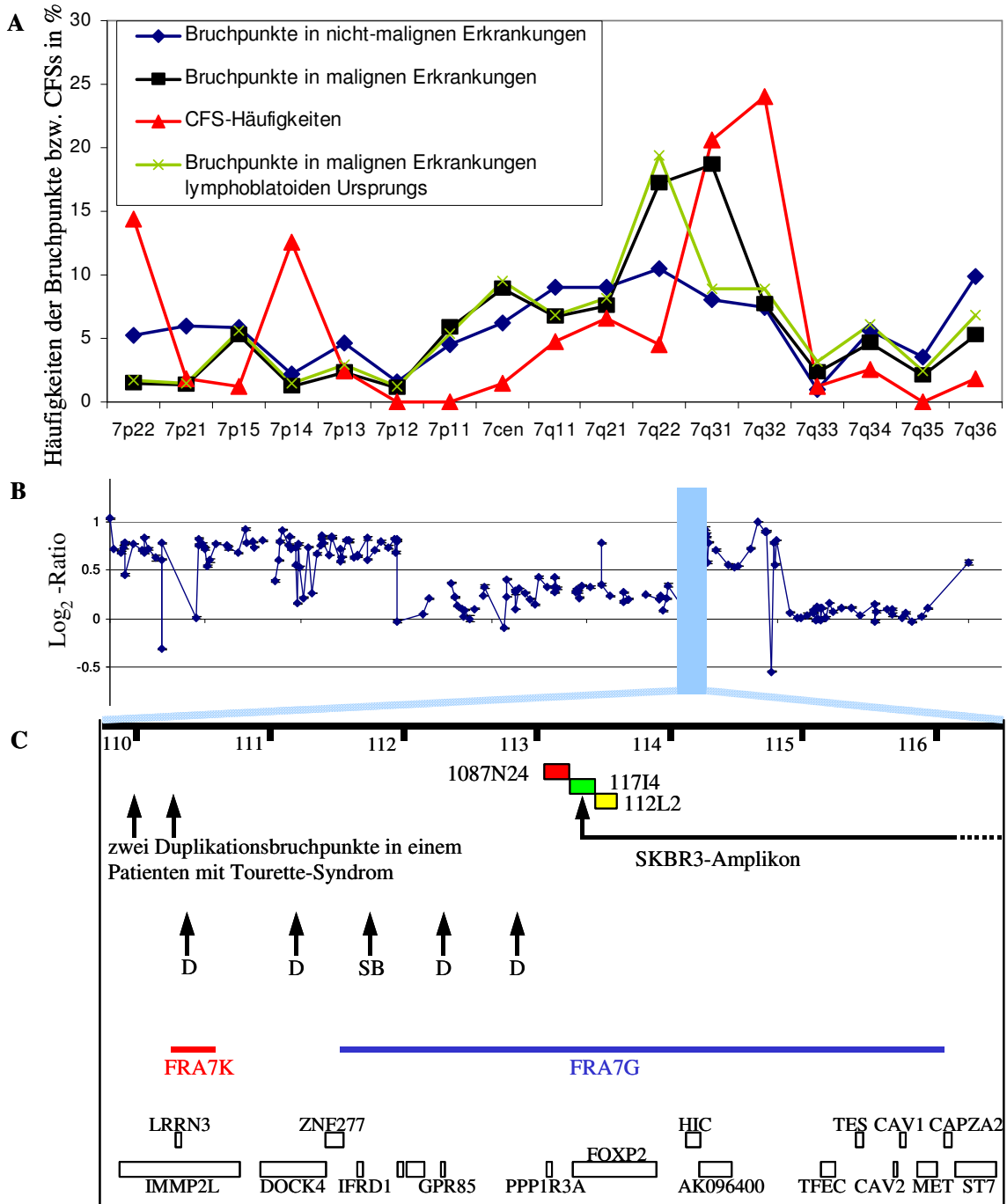


Abbildung 4.4.3 Bruchpunkte auf Chromosom 7. (A) Zytogenetisch kartierte Bruchpunkte bei malignen und nicht-malignen Erkrankungen, entnommen aus www.chr7.org, und CFS-Häufigkeiten, ermittelt von Karen Stout-Weider, wurden einander gegenübergestellt. Die Kurve der CFS-Häufigkeiten korreliert mit keiner der drei Bruchpunktkurven. (B) Das Array-CGH-Profil des Chromosoms 7 der Brustkrebszelllinie SKBR3 (Matthäi *et al.*) weist mehrere Amplifikations- bzw. Deletionsbruchpunkte auf. Die verschiedenen Hybridisierungs-BACs der Array-CGH-Analyse sind entsprechend ihrer Positionen auf dem Chromosom 7 entlang der X-Achse aufgetragen. Die Y-Achse stellt die relativen Häufigkeiten des Vorkommens der jeweiligen Sequenzen in der Zelllinie dar. Der hellblaublaue Bereich schließt den proximalen Beginn einer Amplifikation in 7q31 sowie die CFSs FRA7K und FRA7G ein. (C) Bei der detaillierten Betrachtung der chromosomalen FRA7K / FRA7G-Region wurden verschiedene DNA-Bruchpunkte ermittelt und durch Pfeile gekennzeichnet. Dies sind im einzelnen: der Beginn eines Amplikons in SKBR3 in der

Sequenz des BACs 117I4, zwei Bruchpunkte einer Duplikation in einem Patienten mit Tourette-Syndrom (Petek *et al.*, 2001), ein Mensch / Maus (Ratte) Synteniebruch (SB) und vier segmentale Duplikationen (D). Die Positionen der CFSs basieren für FRA7K auf eigenen Ergebnissen und für FRA7G auf der Arbeit von Hellman *et al.*, 2002. Alle bekannten Gene der Region sind eingezeichnet.

Array-CGH-Analysen der Brustkrebszelllinie SKBR3 ergaben, daß die proximale Grenze eines Amplikons innerhalb einer Region lag, welche das CFS FRA7K einschließt. Das Profil des Chromosoms 7 (Matthäi *et al.*, Manuskript in Vorbereitung) ist in Abbildung 4.4.3(B) gezeigt. Für eine genaue Bestimmung des Beginns des Amplikons wurden FISH-Experimente mit BACs durchgeführt (siehe Abbildung 4.4.4). Die Zielsequenz befand sich auf drei bis fünf separaten Chromosomen; der amplifizierte Abschnitt lag in drei bis vier zusätzlichen Kopien vor. Der zentromerwärts gelegene Bruchpunkt kartierte in die Sequenz des BACs RP11-117I4. RP11-1087N24, überlappend mit der proximalen Endsequenz von RP11-117I4, hybridisierte ausschließlich zu nichtamplifizierter chromosomaler DNA während RP11-112L2, überlappend mit der distalen Endsequenz von RP11-117I4, deutlich stärkere FISH-Signale als RP11-117I4 auf dem Amplikon erzielte. Somit entstand der proximale SKBR3-Amplifikationsbruch in der Region von FRA7G, wie in Abbildung 4.4.3(C) dargestellt ist. Der zweite, distale, Bruchpunkt wurde im Epizentrum von FRA7H gefunden und kartiert in die 250 kb große Region (UCSC Genome Browser) zwischen BAC RP11-990A10 und dem ersten nicht amplifizierten Klon des Arrays, GS1-199H20. Somit liegen beide Grenzen des 7q-Amplikons von SKBR3 in CFS-Regionen.

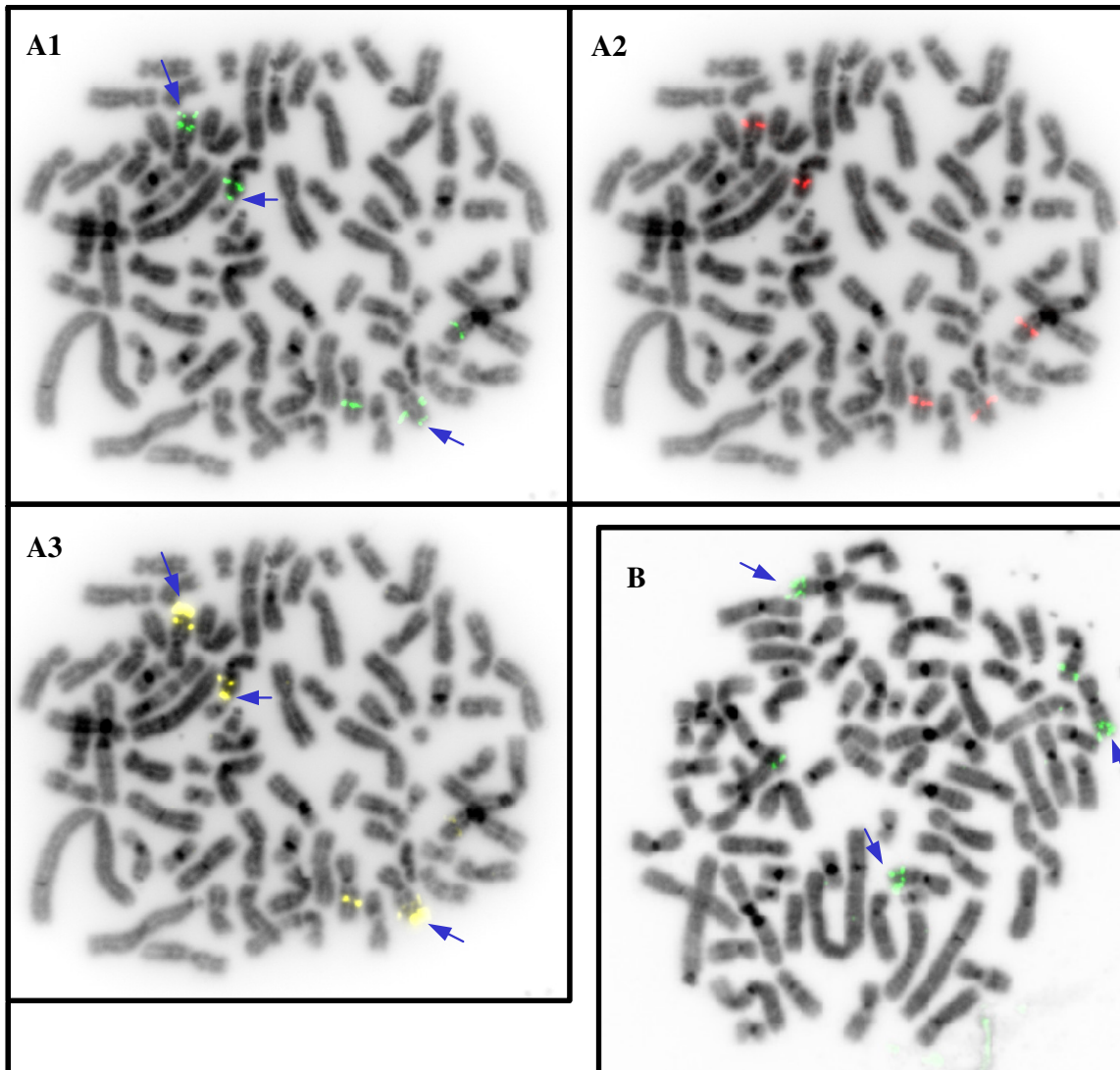


Abbildung 4.4.4 Kartierung der Grenzen eines Amplikons auf Chromosom 7 auf Metaphasechromosomen der Brustkrebszelllinie SKBR3. Das Amplikon ist mit Pfeilen angezeigt. Dargestellt sind die Hybridisierungssignale der BACs 117I4 (A1, FITC, grün), 1087N24 (A2, Tamra, rot) und 112L2 (A3, Cy5, gelb). Die äußeren Sequenzen von 117I4 überlappen mit je einer Endsequenz von 1087N24 und 112L2. 1087N24 gibt keine Signale im amplifizierten Bereich, 117I4 und 112L2 hybridisieren auf dem Amplikon. Damit ist gezeigt, daß die Amplifikation in der Sequenz des BACs 117I4 beginnt. (B) Das distale Ende der gewonnenen Region befindet sich telomerisch zur Sequenz des BACs 990A10 (FITC, grün) im Epizentrum des CFS FRA7H. Beide Chromosom 7-Amplifikationsbruchpunkte kartieren demnach in ein CFS.

Wir suchten nun unter www.chr7.org nach bekannten, molekular kartierten Bruchpunkten innerhalb der FRA7K-Sequenz. Die große Mehrheit der Bruchpunktangaben umfaßte Gebiete von mehreren Mb; nur in einem einzigen Fall wurden die Bruchpunkte exakten Positionen zugeordnet. Dabei handelt es sich um eine segmentale Duplikation in einem Patienten mit Gilles de la Tourette-Syndrom. Den distalen Beginn der Duplikation kartierten Petek *et al.* ins Epizentrum von FRA7K, das distale Ende der Duplikation liegt außerhalb des CFS (Petek *et al.*, 2001). Beide Bruchpunkte sind in Abbildung 4.4.3(C) eingetragen.

Da die erhöhte Instabilität in CFSs möglicherweise am Prozeß der Chromosomenevolution beteiligt ist, suchten wir durch Vergleiche mit anderen Organismen nach Synteniebrüchen innerhalb der 6 Mb großen Region, welche die beiden CFSs in 7q31 beherbergt. Komplett sequenziert und daher geeignet für Synteniestudien sind die Genome von Maus, Ratte und Huhn. Innerhalb des untersuchten Abschnittes des menschlichen Genoms befand sich ein Synteniebruch, welcher Sequenzen mit Homologie zu den Mausechromosomen 12C1 und 6A3, bzw. zu den Rattenchromosomen 6q21 und 4q21 teilt (www.ensembl.org, Version Juli 2004; siehe Abbildung 4.4.3(C)).

Es wurden weiterhin vier segmentale Duplikationen von 6026 bp bis 6521 bp Länge innerhalb der hier untersuchten Region von 6 Mb kartiert, davon eine in FRA7K, zwei in FRA7G und die vierte lag zwischen den beiden CFSs (www.chr7.org). Der Synteniebruch und die segmentalen Duplikationen sind in Abbildung 4.4.3(C) angezeigt. Wir erweiterten unsere Analyse auf den gesamten Chromosomenarm 7q (Abbildung 4.4.5). Die segmentalen Duplikationen sind nicht zufällig über den gesamten Chromosomenarm lokalisiert, sondern sie bilden in der Mehrheit Kluster und treten besonders gehäuft in R-Banden, speziell in Zentromernähe, auf. Diese Kluster segmentaler Duplikationen liegen nicht innerhalb der fünf molekular-zytogenetisch kartierten CFSs auf 7q und nicht in Banden besonders hoher CFS-Expression. Auch die Häufigkeit von Synteniebrüchen entspricht nicht der CFS-Expressionshäufigkeit einer Region.

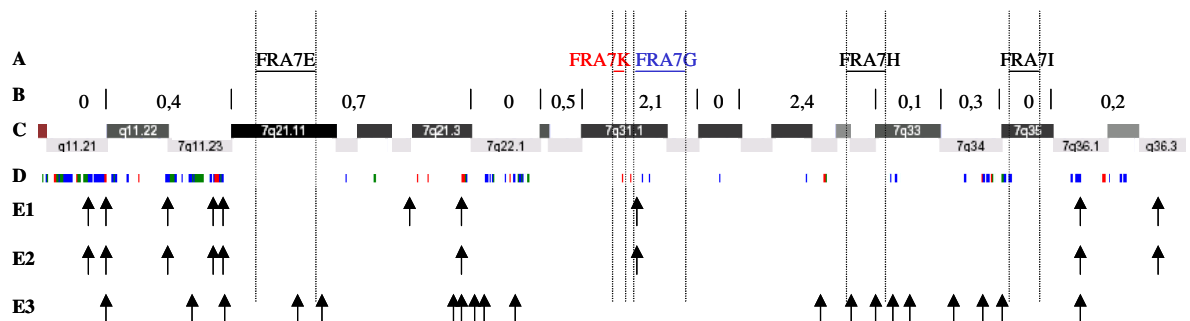
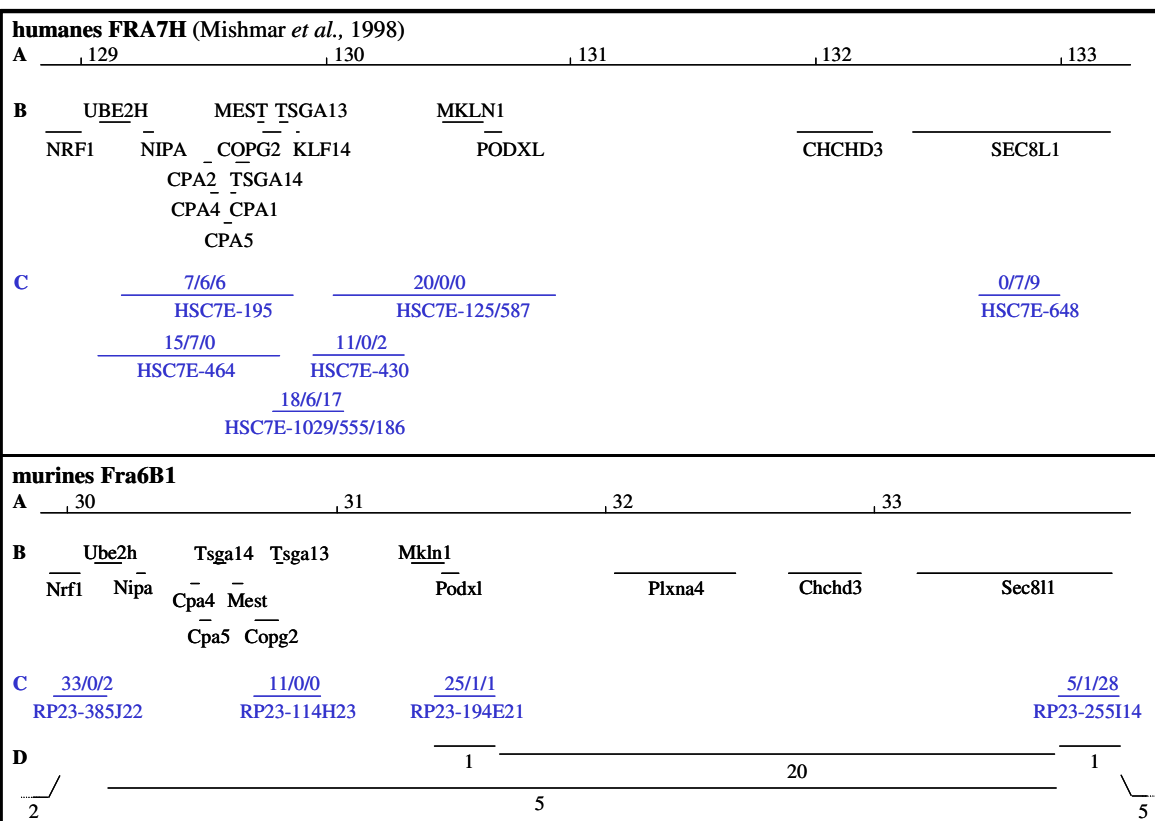
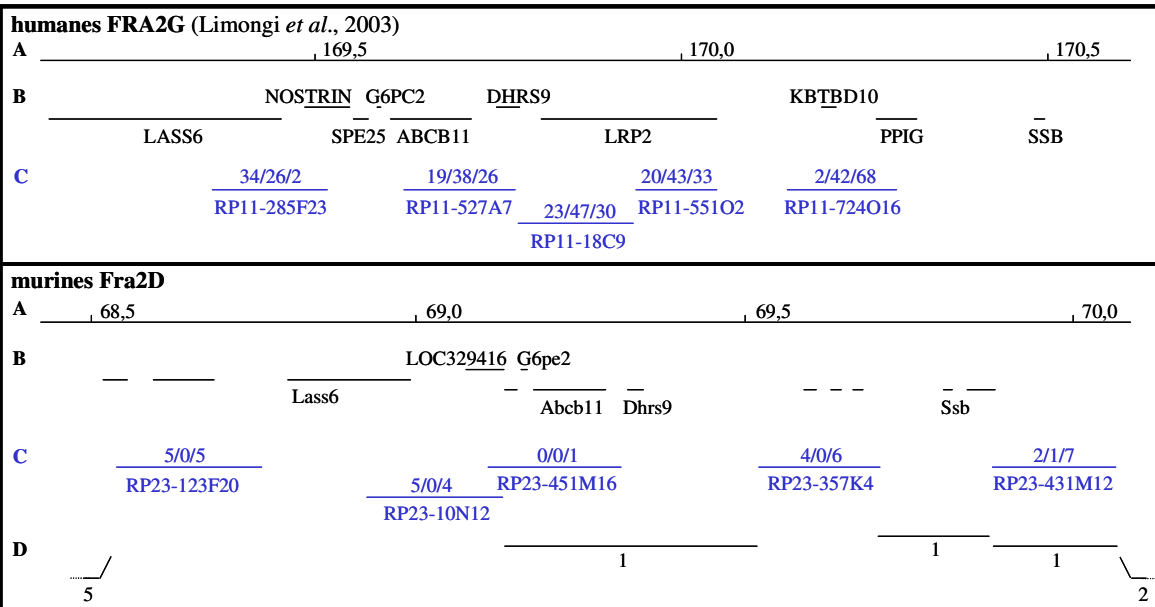


Abbildung 4.4.5 Überblick über CFSs und Stellen evolutionärer Umbauten im humanen Chromosomenarm 7q. Dargestellt sind (A) die molekular-zytogenetisch kartierten CFSs nach Hybridisierungsergebnissen von Zlotorynski *et al.*, 2003 (FRA7E), dieser Arbeit (FRA7K), Hellman *et al.*, 2002 (FRA7G), Mishmar *et al.*, 1998 (FRA7H) und Ciullo *et al.*, 2002 (FRA7I), (B) die CFS-Expressionshäufigkeiten der chromosomalen Banden in Prozent (Stout-Weider *et al.*), (C) das Bandenmuster aus dem UCSC-Browser, (D) segmentale Duplikationen (www.chr7.org, Version Juni 2004, blau: 90-93%, grün: 93-96%, violett: 96-99%, rot: 99-100% Sequenzidentität), und Synteniebruchpunkte zum Maus- (E1), Ratten- (E2) und Huhngenom (E3) (www.ensembl.org, Version Juli 2004). Die fünf klonierten CFSs und Banden hoher CFS-Expressionshäufigkeiten liegen nicht in Regionen vermehrter segmentaler Duplikationen oder Synteniebruchpunkte.

4.5 Molekular-zytogenetische Untersuchungen zur evolutionären Konservierung von CFSs – Vergleich zwischen Maus und Mensch

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.2 belegen die evolutionäre Konservierung der CFS-Expressionshäufigkeiten ganzer Banden in den Mensch / Maus-syntenischen Regionen und in Kapitel 4.4.1 beschrieben wir die Konservierung von FRA7K / Fra12C1 auf molekular-zytogenetischer Ebene. Im folgenden war es unser Ziel zu prüfen, ob weitere CFSs in den exakt homologen Sequenzen exprimiert werden. Für drei humane CFSs (FRA3B, FRA4F und FRA16D) wurde dies bereits von anderen Autoren beschrieben. Wir wollten für fünf zusätzliche molekular-zytogenetisch kartierte menschliche CFSs die homologen Maussequenzen bezüglich ihrer CFS-Expression analysieren. Für eines dieser fünf, FRAXB, wurde unter www.ensembl.org keine Angaben über entsprechende Maussequenzen gemacht. Im UCSC Maus-Browser waren ebenfalls keine Klone für die FRAXB-Gene angegeben. Deshalb versuchten wir durch Blasten der cDNA-Sequenzen der humanen FRAXB-Gene STS und GS1 Sonden zu finden. Als Ergebnis erhielten wir vier RP23-BACs mit einer Positionsangabe auf dem Mausechromosom X oder unbekannt (339M18, 229E11, 31C10 und 166C4). Nur der BAC 229E11, mit übereinstimmenden Sequenzen zum humanen GS1-Gen, gab Hybridisierungssignale auf Chromosom X. Er kartierte in den Bereich der Bande XA7.1, welche mit großer Häufigkeit CFSs exprimiert (1,7% der Gesamtheit der CFSs). Alle 11 daraufhin analysierten CFSs in XA7.1 lagen zentromerisch zum FISH-Signal des RP23-22E11. Wir konnten deshalb nicht feststellen, ob der BAC RP23-22E11 tatsächlich im homologen Bereich von FRAXB liegt, ob die Sequenzen in einem syntenischen Bereich ohne evolutionäres Bruchereignis liegen oder ob FRAXB ein homologes CFS in der Maus hat.

Für die anderen vier Regionen sind die Ergebnisse der FISH-Experimente zur Untersuchung der evolutionären Konservierung von CFSs in Abbildung 4.5 veranschaulicht. Für jedes der untersuchten humanen CFSs wurde ein entsprechendes CFS im Mausgenom an den exakt homologen Sequenzabschnitten nachgewiesen. Gemeinsam mit FRA7K / Fra12C1 (siehe Kapitel 4.4.1) und den drei bereits beschriebenen Homologen FRA3B / Fra14A2 (Glover *et al.*, 1998), FRA4F / Fra6C1 (Rozier *et al.*, 2004) und FRA16D / Fra8E1 (Krummel *et al.*, 2002) ist nun insgesamt für acht von acht untersuchten CFSs eine evolutionäre Konservierung zwischen Mensch und Maus mit molekular-zytogenetischen Methoden detektiert worden.



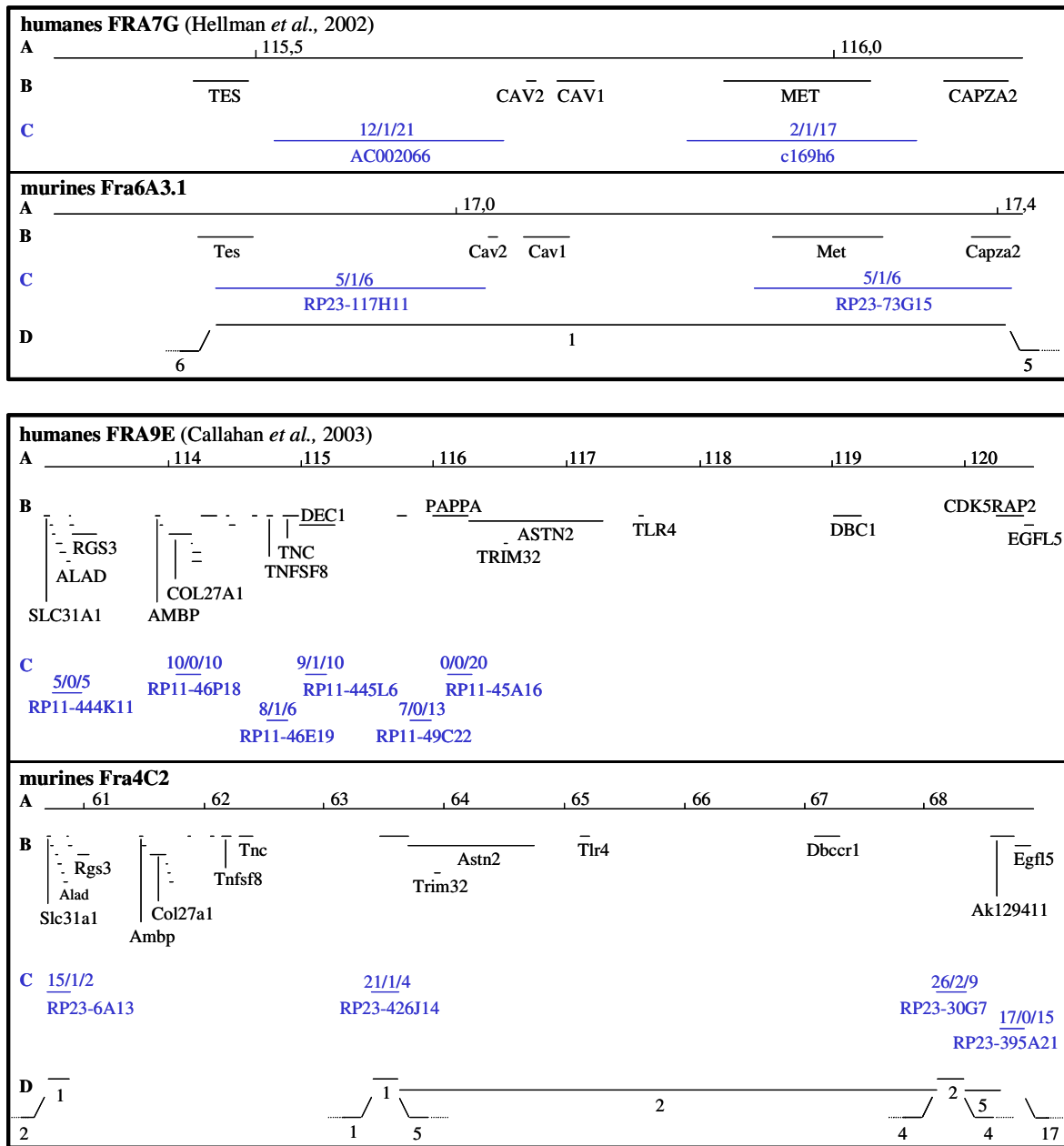


Abbildung 4.5. FISH-Ergebnisse zur Analyse der Konservierung humaner CFSs. Die FISH-Daten der humanen CFSs basieren auf den jeweils zitierten Veröffentlichungen. Die Ergebnisse für die Maus-CFSs sind Teil dieser Arbeit. Gezeigt sind: (A) Megabasenposition auf dem jeweiligen Chromosom, (B) bekannte Gene der Region, (C) hybridisierte BACs und die Anzahl ihrer Signale zentromerisch zum CFS / das CFS überspannend / telomerisch zum CFS, und (D) die Anzahl der von uns analysierten CFSs mit ihren relativen Positionen entweder innerhalb eines BACs, zwischen zwei gemeinsam hybridisierten BACs oder ohne definierte Eingrenzung. Alle vier humanen CFSs wurden in der Maus konserviert gefunden.

Ausgehend von der starken Konservierung der untersuchten CFSs auf molekular-zytogenetischer Ebene und der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Übereinstimmung der Expressionshäufigkeiten zwischen synthetischen Banden erwarteten wir für die homologen CFSs ebenso vergleichbare Fragilitätswerte zu finden. Die Prozentangaben der

acht Homologen pro Gesamtmenge detektierter CFSs sind in Tabelle 4.5 eingetragen. Die Korrelationsanalyse belegte einen signifikanten Zusammenhang zwischen den CFS-Expressionshäufigkeiten der homologen CFSs ($R = 0,762$, $P = 0,028$).

Tabelle 4.5 Molekular-zytogenetisch charakterisierte CFSs des Menschen, ihre Maushomologe und die jeweiligen CFS-Expressionshäufigkeiten der homologen CFSs in % aller CFSs. Die Expressionshäufigkeiten für FRA7K und FRA7G, welche beide den Banden 7q31.1-q31.2 zugeordnet wurden, beruhen auf BAC-Hybridisierungsergebnissen dieser Arbeit.

humane CFSs		homologe CFSs der Maus	
FRA2G (2q31)	0,3	Fra2D (diese Arbeit)	0,2
FRA3B (3p14.2)	3,3	Fra14A2 (<i>Glover et al., 1998</i>)	1,1
FRA4F (4q22)	0,8	Fra6C1 (<i>Rozier et al., 2004</i>)	0,4
FRA6E (6q26)		nicht untersucht	
FRA6F (6q21)		nicht untersucht	
FRA7E (7q21.11)		nicht untersucht	
FRA7K (7q31.1)	2,0	Fra12C1 (diese Arbeit)	5,4
FRA7G (7q31.2)	0,1	Fra6A3.1 (diese Arbeit)	0,2
FRA7H (7q32.3)	2,4	Fra6B1 (diese Arbeit)	1,6
FRA7I (7q35)		nicht untersucht	
FRA9E (9q32)	0,7	Fra4C2 (diese Arbeit)	0,5
FRA16D (16q23.2)	3,1	FRA8E1 (<i>Krummel et al., 2002</i>)	1,8
FRAXB (Xp22.3)		nicht untersucht	

4.6 Analyse möglicher struktureller Gemeinsamkeiten von CFS-exprimierenden Regionen

Die Kenntnis von 13 humanen und acht murinen molekular-zytogenetisch kartierten CFS-exprimierenden Sequenzen bzw. von acht konservierten CFSs war Grundlage für die Suche nach CFS-spezifischen Merkmalen. Ziel war es, durch vergleichende Analysen der DNA-Sequenzen konservierte Gemeinsamkeiten in den CFS-exprimierenden Bereichen zu finden, durch welche sich diese von nichtfragilen Kontrollregionen unterscheiden. Als Kontrollregionen dienten jeweils die zehn stabilsten chromosomalen Regionen des Menschen bzw. der Maus, definiert durch die geringsten P-Werte aus der Berechnung der stabilen Banden. Eine solche Berechnung wurde, wie bereits in Kapitel 4.3.1 für das Mausgenom beschrieben, auch für die menschlichen Chromosomen durchgeführt. Wie in Kapitel 4.3.2 dargestellt, wurden anschließend die humanen Sequenzen als ganze Banden dem UCSC-Browser entnommen, während der Gewinnung der Maus-Sequenzen eine Sequenz-Banden-zuordnung vorausging.

Durch auf Sequenzdaten beruhenden Vergleichen zwischen CFSs und Kontrollregionen sollten die Fragen beantwortet werden, ob CFS-exprimierende Regionen i) im Laufe der Evolution vermehrt in chromosomale Umbauten involviert wurden, ii) eine erhöhte DNA-Helix-Flexibilität aufweisen, und iii) Gemeinsamkeiten in ihren kodierenden Bereichen erkennen lassen. Mit diesen drei Fragestellungen befassen sich die folgenden Abschnitte. Die Ergebnisse sind im Anhang zusammengefaßt.

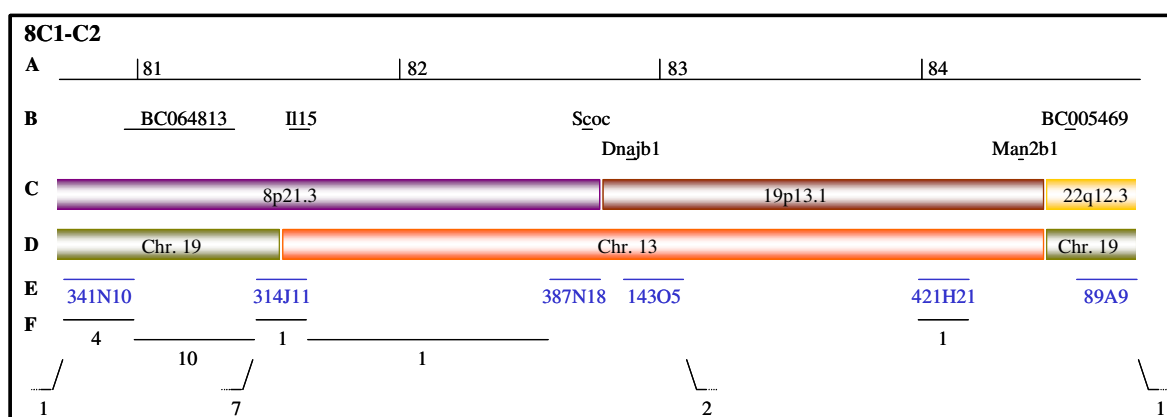
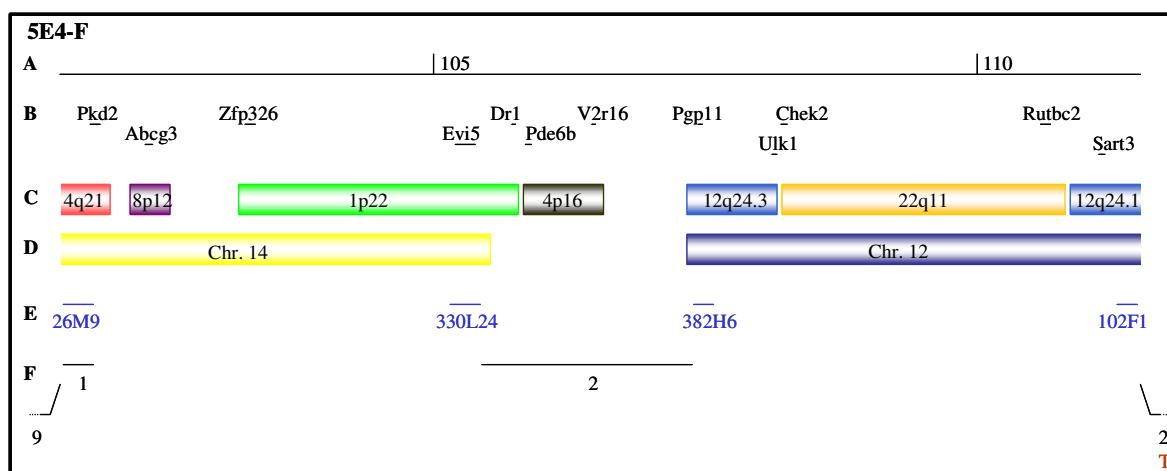
4.6.1 Evolutionäre Bruchpunkte

Da CFSs Stellen erhöhter Brüchigkeit darstellen, interessierte uns die Frage, inwieweit diese DNA-Abschnitte in die Evolution der Chromosomen einbezogen waren. Die Linien von *Mus musculus* und *Homo sapiens* trennten sich vor etwa 92 Mio. Jahren (Ureta-Vidal *et al.*, 2003) und bis zur Entstehung der gegenwärtigen Genome fanden eine Vielzahl chromosomaler Umbauten statt. Synteniebrüche trennen heute 288 konservierte Segmente zwischen den beiden Genomen (Gregory *et al.*, 2002). Ein Vergleich aller dieser Synteniebruchpunkte mit Stellen von CFSs wird erschwert durch die Tatsache, daß beide Ereignisse in nahezu allen Chromosomenbanden auftreten (www.ensembl.org, Version Juli 2004) und daß bisher nur 13 CFSs auf molekularer Ebene charakterisiert wurden. Wie im Anhang zu sehen ist, überspannen nur zwei davon (FRA4F und FRA7G) einen Synteniebruch zwischen Mensch und Maus. Zehn CFSs liegen innerhalb eines Syntenieblocks und für ein CFS (FRAXB) ist eine solche Unterscheidung aufgrund mangelnder Information in den Datenbanken nicht möglich. Durchschnittlich traten evolutionäre Brüche in den analysierten CFS-Sequenzen alle 22,3 Mb im Menschen und alle 28,4 Mb in der Maus auf. In den nichtfragilen Kontrollregionen waren es ein Bruch in 11,4 Mb im Menschen und in 18,4 Mb in der Maus. Demnach liegen CFSs also nicht vermehrt in Regionen evolutionärer Umbauten.

Im folgenden untersuchten wir, ob evolutionär besonders instabile Regionen mit CFS-exprimierenden Sequenzen übereinstimmen. Wir suchten unter Verwendung der Datenbank Ensembl Genome Browser (Version November 2002) nach Stellen im Mausgenom, welche in naher Nachbarschaft (weniger als 3 Mb Distanz) mehr als einen interchromosomalen Umbau zum humanen und mindestens einen weiteren zum Rattengenom aufwiesen. Neun solcher evolutionär extrem instabilen Regionen wurden identifiziert und in Tabelle 4.6.1 aufgelistet. Die Mehrzahl der betroffenen Regionen weist Banden mit einer Häufigkeit der CFS-Expression auf, die im Vergleich zum Mittel über alle Banden des Mausgenoms (0,25% der Gesamtheit der CFSs) erhöht ist. Dennoch exprimieren einige der evolutionär extrem instabilen Banden nur seltene CFSs. Wir analysierten drei der extrem instabilen Regionen aus Tabelle 4.6.2 mit erhöhter CFS-Expression genauer (5E4-F, 8C1-C2 und 11A4, siehe auch Abbildung 4.6.1). Für die Lokalisation der CFSs relativ zu den Synteniebruchpunkten wurden BACs ausgesucht, deren Sequenzen die evolutionären Bruchpunktregionen überspannen. FISH-Experimente dieser DNA-Proben auf APC-behandelte Lymphozyten-Metaphasen der Maus sollten über eine mögliche Kolo-kalisation von CFSs mit evolutionären Bruchereignissen Aufschluß geben. In 5E4-F und 11A4 wurde die Expression von CFSs innerhalb der evolutionär extrem instabilen Region mit geringer Häufigkeit detektiert. Die Mehrzahl der Chromatinlücken / Doppelstrangbrüche wurde außerhalb des untersuchten Abschnittes gefunden. Auch von den 28 analysierten CFSs in 8C1-C2 fanden wir nur wenige (fünf) innerhalb des Synteniebruch-Bereiches. Die häufige CFS-Expression der Bande 8C1 betrifft einen Bereich von weniger als 1 Mb, welcher sich zentromerisch direkt an die evolutionär instabile Region anschließt.

Tabelle 4.6.1 Evolutionär extrem instabile Bereiche im Genom der Maus

chromosomale Position	Häufigkeit der CFS-Expression in % der Gesamtheit der CFSs	Positionen der CFSs relativ zur evolutionär extrem instabilen Region
5B1	0,46	nicht untersucht
5E4-F	0,69; 0,03; 0,29	10 CFSs proximal; 2 CFSs überspannend; 2 CFSs distal
8C1-C2	1,51; 0,00	22 CFSs proximal; 5 CFSs überspannend; 1 CFSs distal
10B5.3-C1	0,03; 0,46	nicht untersucht
11A4	0,86	6 CFSs proximal; 3 CFSs überspannend; 13 CFSs distal
13B3	0,37	nicht untersucht
16B1	0,14	nicht untersucht
17B1	0,00	nicht untersucht
17B2	1,46	nicht untersucht
genomischer Durchschnitt	0,25	nicht untersucht



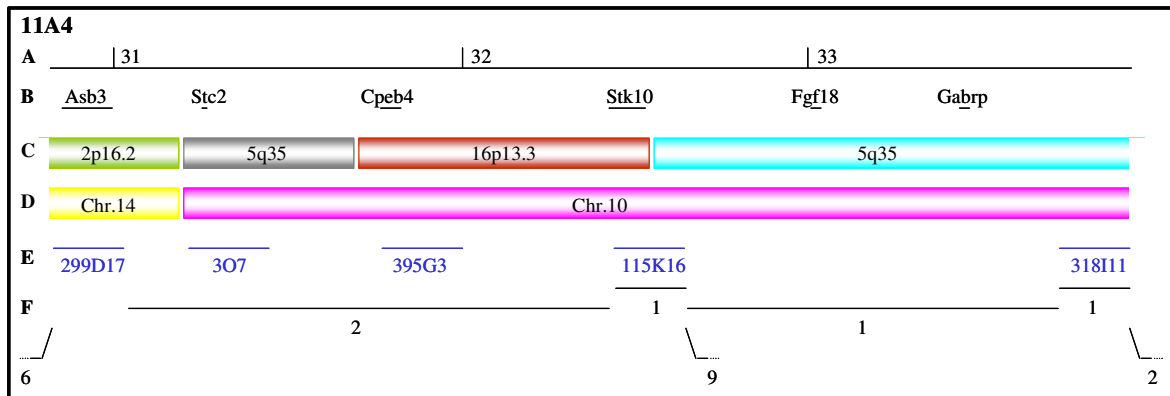


Abbildung 4.6.1 CFS-Kartierung in den evolutionär extrem instabilen Regionen 5E4-F, 8C1-C2 und 11A4 des Mausgenoms. (A) Megabasenposition auf dem jeweiligen Chromosom, (B) ausgewählte Gene der Regionen, (C) syntenische Regionen im menschlichen Genom, (D) syntenische Regionen im Ratten-Genom, (E) hybridisierte BACs und die Anzahl ihrer Signale zentromerisch zum CFS / das CFS überspannend / telomerisch zum CFS, und (F) die relativen Positionen der analysierten CFSs. Die CFSs traten in keiner der drei Regionen bevorzugt im Bereich der Synteniebrüche auf. Das rote T symbolisiert die Position des rekurrenten Translokationsbruchpunktes in 5E5/F in c-myc-aktivierten Lymphomen. Der Bruchpunkt kartiert nicht in eine Region erhöhter CFS-Expression und nicht in einen Synteniebruch.

4.6.2 DNA-Helix-Flexibilität

Auf der Suche nach dem zellulären Mechanismus, welcher die Expression von Brüchen speziell an CFSs bewirkt, wurden seit 1998 (Mishmar *et al.*, 1998) Untersuchungen der DNA-Helix-Flexibilität durchgeführt. In allen bisher untersuchten CFS-Bereichen wurden Regionen mit erhöhter Helix-Flexibilität gefunden. Der für die Analyse verwendete Parameter mißt potentielle lokale Veränderungen in der DNA-Struktur, die sich als Schwankungen im Biegungswinkel darstellen. Anhand des Computerprogramms TwistFlex wird die Flexibilität einer eingegebenen DNA-Sequenz in überlappenden Fenstern entlang der Sequenz berechnet. Einzelne Dinukleotidwerte, von denen die A/T-Basenfolge den höchsten Wert erzielt, werden innerhalb eines Fensters addiert und über die gesamte Fensterbreite gemittelt.

In dieser Arbeit verwendeten wir mit TwistFlex jenes Programm, welches in der Studie Zlotorynski *et al.*, 2003 eingesetzt wurde. Darüberhinaus benutzten wir die identischen Werte für die Parameter Fenstergröße, Schrittweite und Grenzwert für erhöhte Flexibilität. Zur internen Kontrolle errechneten wir noch einmal ein Beispiel aus der Studie Zlotorynski *et al.*, 2003. Dort wurden die Ergebnisse für 4,5 Mb FRA7E-Sequenz und 1,5 Mb FRA7I-Sequenz zusammengefaßt. Wir analysierten mittels TwistFlex ebenfalls die 4,5 Mb von FRA7E und 1,5 Mb von FRA7I; die Sequenzen gewannen wir entsprechend den Angaben aus Zlotorynski *et al.*, 2003 aus der UCSC-Browser Version vom November 2002. Die Anzahl der Flexibilitätsinseln pro Mb betrug in der Literatur 57; wir ermittelten 58,7 Flexibilitätsinseln pro Mb. Die Anzahl von Flexibilitätsklustern pro Mb war mit 3,3 angegeben; wir errechneten denselben Wert. Der geringfügige Unterschied in der Menge der Flexibilitätsinseln ist vermutlich durch kleine Abweichungen in den genauen Grenzen der zu analysierenden Sequenzen zustande gekommen, da diese nur in Form der ersten und

letzten Marker, nicht aber als Basenposition angegeben waren. Trotz dieses Unterschiedes war deutlich zu erkennen, daß wir mit TwistFlex und den von uns eingesetzten Parametern die Ergebnisse von Zlotorynski *et al.*, 2003 rekapitulieren.

Wir verglichen weiterhin die Flexibilitätswerte von FRA7K und FRA7G mit dem Teil der Bande 7q31.1 (zwischen den Markern SHGC-80779 und SHGC-112009), welcher zentromerisch von FRA7K liegt und in dem mittels FISH-Analyse (siehe Abbildung 4.4.2) keine CFS-Expression gefunden wurde. Diese Kontrollregion enthielt mehr Inseln und Kluster hoher Flexibilität (45,5 Inseln und 2,7 Kluster pro Mb) als die Sequenzen von FRA7K und FRA7G (33,2 bzw. 41,9 Inseln und 0 bzw. 1,8 Kluster pro Mb) (siehe Anhang).

Wir erweiterten diese Analyse auf alle molekular-zytogenetisch kartierten CFSs von Mensch und Maus. Die errechneten Flexibilitätswerte der analysierten Bereiche sind im Anhang eingetragen. CFSs und Kontrollregionen wurden in G- und R-Bandenregionen aufgeteilt, da sich G-Banden durch einen höheren Anteil an AT-Basen auszeichnen und die Basenabfolge das entscheidende Kriterium zur Berechnung der Flexibilitäten darstellt.

Beim Vergleich der Flexibilitätswerte aller im Anhang aufgelisteten CFSs und Kontrollregionen mittels des Mann-Whitney U-Tests wurde deutlich, daß es weder im Menschen noch in der Maus signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Flexibilitätsinseln oder –klustern zwischen den Regionen der CFSs und denen der Kontrollregionen gab. Tabelle 4.6.2 enthält die mittleren Flexibilitätswerte aus der Summe der analysierten CFSs und Kontrollregionen und die entsprechenden P-Werte des Mann-Whitney U-Tests. In keiner Gruppe waren die DNA-Helix-Flexibilitäten zwischen CFSs und Kontrollregionen signifikant verschieden.

Tabelle 4.6.2 Mittlere Dichte an Flexibilitätsinseln und –klustern, errechnet aus der Summe aller analysierten CFSs und Kontrollregionen, getrennt nach G- und R-Banden. Die P-Werte für einen Unterschied zwischen CFSs und Kontrollregionen wurden basierend auf den Einzelwerten mittels des Mann-Whitney U-Tests errechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von Flexibilitätsinseln oder –klustern zwischen den Gruppen der CFSs und der Kontrollregionen gefunden.

	Mittelwerte der Flexibilitäts- Inseln / Mb		Mittelwerte der Flexibilitäts- Kluster / Mb	
	G-Banden	R-Banden	G-Banden	R-Banden
humane CFSs	41,7	31,0	1,9	0,8
humane Kontrollregionen	39,6 (P = 0,91)	41,6 (P = 0,49)	1,7 (P = 0,83)	2,2 (P = 0,17)
Maus-CFSs	47,7	40,2	3,4	1,2
Maus-Kontrollregionen	49,3 (P = 0,31)	50,9 (P = 0,46)	2,4 (P = 0,25)	2,7 (P = 0,14)

Darüberhinaus korrelierte die Zahl der Flexibilitäts-Inseln nicht mit der Expressionshäufigkeit der CFSs (Mensch: CFSs in G-Banden Spearman $R = 0,543$, $P = 0,266$, CFSs in R-Banden $R = 0,071$, $P = 0,879$; Maus: CFSs in G-Banden $R = 0,500$, $P = 0,667$, CFSs in R-Banden $R = 0,100$, $P = 0,873$). So enthält zum Beispiel die FRA16D exprimierende Sequenz weniger Flexibilitäts-Inseln und –kluster als die Region des weniger häufig beobachteten CFS FRA7E. Auch in den Epizentren von FRA3B und FRA7H war keine Steigerung der Flexibilitätswerte gegenüber der jeweiligen größeren Gesamtregionen zu erkennen. Im Vergleich der homologen Mensch/Maus-CFSs wurde zwar eine Konservierung der Anzahl der Flexibilitäts-Inseln sichtbar ($R = 0,786$; $P =$

0,021), die Zahl der Cluster korrelierte dagegen nicht ($R = 0,265$; $P = 0,526$). Abbildung 4.6.2 zeigt an einem Beispiel die Helix-Flexibilität in homologen CFS-Bereichen. Die Positionen der Flexibilitäts-Inseln wurden nicht in den exakt entsprechenden Sequenzabschnitten konserviert gefunden.

Somit steht fest, daß eine erhöhte Helix-Flexibilität weder eine evolutionär konservierte noch eine spezifische Eigenschaft der CFSs darstellt.

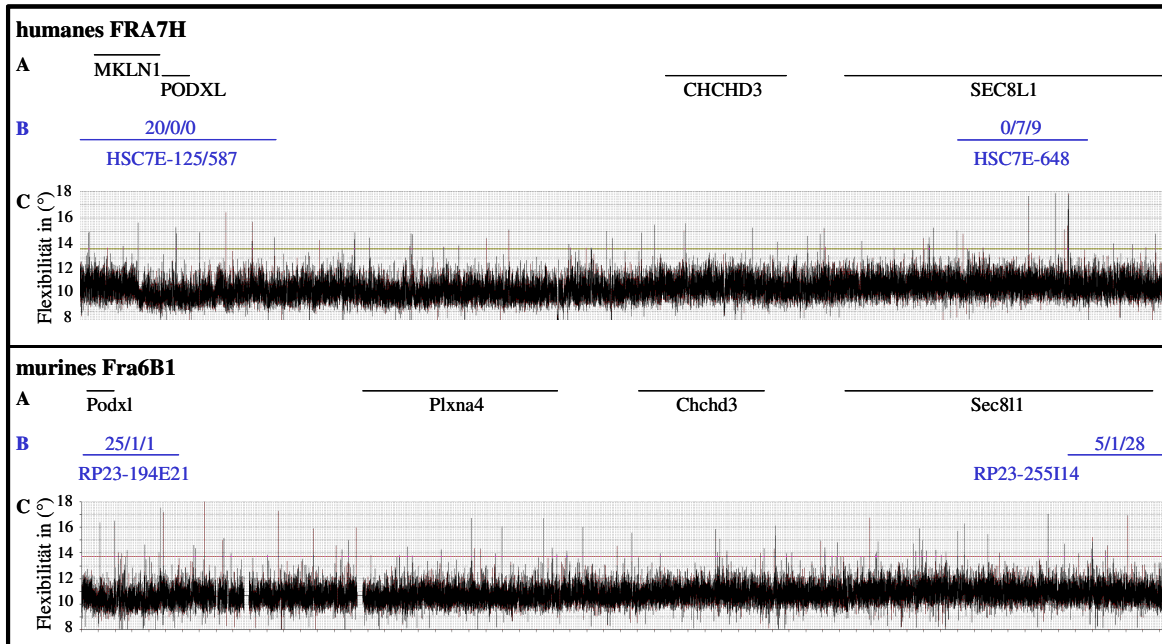


Abbildung 4.6.2 DNA-Helix-Flexibilitätswerte innerhalb von FRA7H und seinem Maus-Homolog Fra6B1. (A) Gene in der analysierten Region, (B) Ergebnisse zur molekular-zytogenetischen CFS-Kartierung von FRA7H (entnommen aus Mishmar *et al.*, 1998), und Fra6B1 (aus dieser Arbeit), (C) Die Höhe der DNA-Helix-Flexibilitäten innerhalb der beiden CFSs. Auf der Y-Achse sind die Flexibilitätswerte der einzelnen Fenster entlang der Gesamtlänge von 2,6 Mb (X-Achse) dargestellt. Die rote horizontale Linie symbolisiert den Schwellenwert $13,7^\circ$ für signifikant erhöhte Flexibilität. Der Graph der Maus-Sequenz enthält zwei Lücken, welche Lücken in den verfügbaren Sequenzdaten widerspiegeln. Inseln erhöhter DNA-Helix-Flexibilität sind nicht in genau homologen Bereichen konserviert.

4.6.3 Lange Sequenzabschnitte überspannende Gene

Auffällig in den Bereichen der CFSs ist das häufige Vorkommen von Genen, deren Exons sich über ungewöhnlich lange Sequenzabschnitte erstrecken. Sechs der 12 humanen CFSs aus der Literatur und ihre sieben Maus-Homologen überspannen kodierende Regionen von Genen > 650 kb (Anhang). Auch das hier vorgestellte, neu charakterisierte dreizehnte, FRA7K, und sein Maus-Homolog Fra12C1 liegen innerhalb eines großen Gens: *IMMP2L* / *Imp2l* (humanes / murines Homolog der mitochondrialen inner-Membranpeptidase Untereinheit 2 der Hefe). Das *IMMP2L* / *Imp2l* - Gen setzt sich aus sechs Exons zusammen, welche sich über 899 kb Humansequenz bzw. 983 kb Maussequenz erstrecken.

Im Vergleich dazu sind Gene mit vergleichbarer Länge in den als stabil errechneten Banden wesentlich seltener kartiert. In der Gesamtheit von 44,65 Mb molekular analysierter CFS-Sequenz des Menschen liegen acht Gene, die jeweils mehr als 650 kb beanspruchen. Diese kartieren vornehmlich in die Regionen besonders häufiger CFSs (siehe Anhang). In 151,26 Mb stabiler Kontrollsequenz befinden sich nur sechs Gene > 650 kb. Somit tritt ein lange Sequenzabschnitte überspannendes Gen in CFSs durchschnittlich alle 5,58 Mb auf, in Kontrollregionen dagegen nur alle 25,21 Mb. Für die Maus ist in keiner der zehn Kontrollregionen ein langes Gen bekannt.

Wir extrahierten weiterhin aus der Datenbank GNF SymAtlas die transkriptionelle Aktivität dieser Gene > 650 kb, die in CFSs bzw. in Kontrollregionen lokalisiert sind, für diejenigen Gewebetypen, in welchen uns CFS-Kartierungsdaten zur Verfügung standen. Die CFS-Häufigkeiten der Chromosomenbanden basierten auf Studien an T-Lymphozyten (Stout-Weider *et al.*), Hautfibroblasten (Murano *et al.*, 1989b), Amniozyten (Simonic & Gericke, 1996) und Knochenmarkzellen (Murano *et al.*, 1989a). Für die Gene der CFSs wurden in diesen vier Zelltypen häufig RNA-Expressionswerte von über 300 gefunden (siehe Anhang). Die großen Gene der Kontrollregionen zeigten dagegen geringere RNA-Expressionswerte von maximal 300. Für die Maus stehen noch keine Gen-Expressionsdaten in den Datenbanken zur Verfügung.

5 Diskussion

5.1 Murine ARF-defiziente *Eμ-myc*-B-Zell-Lymphome entwickeln in Abhängigkeit ihres INK4a-Status spezifische zytogenetische Aberrationen mit prognostischer Relevanz

Wir untersuchten in dieser Arbeit Lymphome des *Eμ-myc* / *INK4a*/ARF+/- bzw. ARF+/- transgenen Mausmodells von Schmitt *et al.* mit molekular-zytogenetischen Methoden, um i) neue Kenntnisse über die Wirkungsweisen der Tumorsuppressoren INK4a und ARF im neoplastischen Prozeß zu gewinnen, um ii) durch einen Vergleich unserer Ergebnisse mit den Therapiedaten der transplantierten Tumore von Schmitt *et al.* genetische Marker für therapierelevante Subklassifizierungen ARF-defizienter Tumore identifizieren zu können, und iii) mögliche rekurrente Chromosomentranslokationen in Bezug auf das Auftreten von CFSs zu analysieren.

Durch Kreuzungsexperimente generierten Schmitt *et al.* *Eμ-myc*-transgene Mäuse mit heterozygoten Deletionen in entweder *ARF* oder *INK4a* und *ARF* (siehe Kapitel 1.2.2). Die c-myc-überexprimierenden Tiere entwickelten B-Zell-Lymphome, welche mittels *CDKN2A*-Exon-spezifischer Multiplex-PCR und ARF-Immunoblot-Analysen als *ARF*null-, *INK4a*/ARFnull- oder Kontrolllymphome klassifiziert wurden. Dabei können wir nicht ausschließen, daß Alterationen am *INK4a*/ARF-Lokus unentdeckt blieben, welche durch Mechanismen wie Blockierung der Transkription aufgrund von Promotor-Hypermethylierung oder durch extragenische Defekte hervorgerufen wurden.

Die häufige homozygote Deletion des Exons 2 in den analysierten Lymphomen (in 5 von 11 Tumoren aus intaktem *INK4a*/ARF-Hintergrund, in einem von 14 Tumoren aus dem ARF+/- Hintergrund und in 11 von 13 Tumoren aus dem *INK4a*/ARF+/- Hintergrund) ist ein Hinweis darauf, daß neben der Inaktivierung von ARF auch der Verlust von INK4a bei der Tumorgenese von Bedeutung ist. Für diese Annahme spricht ebenso, daß Lymphome aus dem *INK4a*/ARF+/- Hintergrund signifikant schneller entstanden als Lymphome aus dem ARF+/- Hintergrund. Die mittlere Latenz betrug bei den *INK4a*/ARF+/- -Tieren 32 (± 5) Tage und bei den ARF+/- -Tieren 51 (± 18) Tage (Mann-Whitney U-Tests, P = 0,003). INK4a besitzt somit vermutlich - zumindest bei Verlust von ARF - ein Tumor-supprimierendes Potential.

5.1.1 Unterschiedliche Mutationen am *INK4a*/ARF-Lokus bewirken gemeinsame und spezifische zytogenetische Aberrationen

Da nahezu alle Tumore in diesem Modell (37 von 38 untersuchten Fällen) molekular-zytogenetisch detektierbare Chromosomenaberrationen aufwiesen, ist die Kombination von aktiviertem c-myc und dem Verlust von ARF bzw. von INK4a und ARF für eine sofortige maligne Transformation *in vivo* offensichtlich nicht ausreichend.

In *INK4a*/ARFnull-Lymphomen wurden signifikant weniger Aberrationen gefunden als in ARFnull-Lymphomen. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß ARFnull-Lymphome zusätzliche Defekte benötigen, um ein onkogenes Potential zu entwickeln, welches mit

*INK4a/ARF*null-Lymphomen vergleichbar ist. Die „Suche“ nach weiteren Alterationen kann eine Erklärung für die signifikant schnellere Entstehung von *INK4a/ARF*null-Lymphomen gegenüber *ARF*null-Lymphomen darstellen.

Besondere Beachtung findet in diesem Zusammenhang der Gewinn von Chromosom 14, welcher in acht von 15 (53%) *ARF*null-Lymphomen aber in keinem der *INK4a/ARF*null-Lymphome detektiert wurde. Die zusätzliche Kopie des Chromosoms 14 in *ARF*null-Lymphomen könnte zumindest teilweise das onkogene Potential kompensieren, welches andernfalls durch einen Verlust der *INK4a*-Komponente in *INK4a/ARF*null-Lymphomen während der Tumorentwicklung erworben wird. Andererseits könnte die Kombination einer solchen Anomalie mit dem Verlust von *INK4a* in ein und derselben Zelle zu Letalität führen. Auf der Suche nach einem möglichen Tumor-relevanten Locus auf Chromosom 14 richteten wir unser Augenmerk auf die beiden Zyklin-abhängigen Kinasen *CDK4* und *CDK6*, welche von *INK4a* negativ reguliert werden. Ein Gewinn ihrer Aktivität könnte einen Verlust von *INK4a* phänotypisch kopieren. Jedoch kartieren die Gene *CDK4* und *CDK6* der Maus in 10D3 und 5A2 und bilden somit nicht die Ursache für den häufigen Gewinn des Chromosoms 14 in *ARF*null-Lymphomen.

Rekurrente Aberrationen in *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Tumoren, welche in Kontrolllymphomen nicht beobachtet wurden, waren der Gewinn des kompletten Chromosoms 1 sowie ein Gewinn der Region 5E5/F-tel, verursacht durch eine Translokation an 5E5/F mit den verschiedenen Partnerchromosomen 2, 4 und 17 oder resultierend aus einem zusätzlichen deletierten Chromosom 5. Das wiederholte Auftreten eines Bruchpunktes struktureller Umbauten an der gleichen Bandenposition legt die Vermutung nahe, daß der Bereich der Banden 5E5/F eine Zielstruktur trägt, welche bei irregulärem Zusammenschluß mit anderen genomischen Regionen den Prozeß der Tumorentstehung fördert. Möglicherweise beruht dies auf der Aktivierung eines Protoonkogens bzw. der Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens in der Region 5E5/F. Ebenso denkbar ist die Positionierung eines regulatorischen Elements auf 5E5/F, welches bei Verbindung mit den kodierenden Sequenzen anderer Gene deren Aktivität ändert. Das Chromosom 1 und die chromosomale Region 5E5/F der Maus tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit Zielstrukturen, welche durch Zunahme ihrer Kopienzahl bzw. durch Änderung ihrer normalen genomischen Umgebung, die Transformation einer Zelle in eine Tumorzelle fördern.

Rekurrente Aberrationen in *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Lymphomen, welche auch in Kontrolllymphomen gefunden wurden, waren die Zugewinne der Chromosomen 3, 6 und 18. Wir ziehen daraus den Schluß, daß diese Chromosomen vermutlich Träger von Genen sind, welche in c-myc-aktivierten Zellen, unabhängig von deren *INK4a/ARF*-Status, als Protoonkogene wirken.

Molekular-zytogenetische Untersuchungen an einem vergleichbaren Mausmodell mit Lymphombildung wurden von Coleman *et al.* beschrieben. Die BALB/c-Mäuse dieser Studie trugen eine c-myc-aktivierende Translokation, zusätzliche Defekte wurden nicht induziert. Damit ähnelten die Tiere den C57BL/6-Kontrolltieren (Cn) unserer Arbeit. Die Mäuse entwickelten Plasmazytome, welche mittels SKY-Analysen untersucht wurden (Coleman *et al.*, 2000).

Im Gegensatz zu den 38 pseudo-diploiden Lymphomen unserer Studie war die Mehrzahl der Plasmazytome tetraploid. Eine mögliche Ursache für die Tetraploidien könnte der Funktionsverlust von p53 sein. *ARF*-defiziente Zellen dagegen würden durch

einen zusätzlichen Verlust von p53 keinen selektiven Vorteil erlangen; in allen getesteten *INK4a/ARF*-null-Tumoren wurde die Wildtyp-p53-RNA detektiert (Schmitt *et al.*, 1999). Der zweite wesentliche Unterschied zu unseren Ergebnissen bestand in der von Coleman *et al.* beschriebenen großen Häufigkeit struktureller Aberrationen, wie Translokationen und Duplikationen. Dies ist vermutlich mit den verschiedenen genetischen Hintergründen der beiden verwendeten Mausstämmen zu erklären. BALB/c-Mäuse besitzen Stammspezifische Sequenzvarianzen, die nach DNA-Schädigung eine höhere Anzahl an Doppelstrangbrüchen und Translokationen gegenüber C57BL/6-Zellen verursachen (Ponnaiya *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001; siehe auch Kapitel 5.3).

Die von uns beobachteten rekurrenten Aberrationen, welche auch in den Kontrolllymphomen zu finden waren, wie die Gewinne der Chromosomen 3, 6, 14 und 18, traten im Plasmazytom-Modell als seltene Ereignisse auf. Diese Aberrationen sind demnach in Kombination mit Defekten, welche in unserem Modell nicht auftraten, zum Beispiel mit Defekten in *p53*, ohne Wachstumsvorteil für die Zelle.

Die am häufigsten beschriebenen Aberrationen bei Coleman *et al.* waren ein (partieller) Gewinn von Chromosom 1 (in 15 von 29 Tumoren), insbesondere der Banden 1B/C, und Translokationen der chromosomalen Bande 5F bzw. 5E/F (in 16 von 29 Tumoren) mit verschiedenen Partnern. Zu den Translokationspartnern zählten unter anderem auch die Banden 2D/E und 5B, welche ebenso in unserer Studie zu 5E5/F transloziert gefunden wurden. Aufgrund der übereinstimmenden Auffindung eines Gewinns von Chromosom 1 und einer Translokation an 5E/F tragen die chromosomalen Regionen 1B/C und 5E/F mit hoher Wahrscheinlichkeit Gene, welche den neoplastischen Prozeß c-myc-aktivierter Zellen fördern.

Da der Großteil der gefundenen Aberrationen Gewinne ganzer Chromosomen darstellt bzw. chromosomale Regionen mehrerer Banden umfaßt, erweist sich die Suche nach Kandidatengenen, welche bei der Tumorentstehung von Bedeutung sind, als schwierig. Weiterführende Studien sind daher nötig, um die Zielstrukturen auf den Chromosomen 1 (B/C), 3, 5E5/F, 6, 14 und 18 der Maus sowie deren humane Homologen aufzufinden und ihre Funktionen z.B. als Protoonkogene genauer zu untersuchen.

5.1.2 Der Gewinn von Chromosom 6 ist mit einer verminderten, der von Chromosom 14 mit einer gesteigerten Therapierbarkeit von *ARF*-null-Lymphomen assoziiert

An der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle sind mehrere Mutationen beteiligt, die einerseits eine Aktivierung von Onkogenen und andererseits eine Inhibierung von Tumorsuppressorgenen bewirken. Histologisch identische Tumore können dabei aufgrund von Veränderungen in verschiedenen Signalwegen entstehen. Darauf begründet sich ein unterschiedlicher Erfolg in der Anwendung von Chemotherapie bei der Behandlung von Krebs. Da die Gene und die zellulären Prozesse, welche über Erfolg oder Mißerfolg der Behandlung entscheiden, noch immer kaum verstanden sind, war es Ziel unserer Untersuchungen, den Einfluß genetischer Faktoren auf die Therapieantwort zu studieren.

Dafür wurde ein Teil der zytogenetisch charakterisierten murinen B-Zell-Lymphome mit *INK4a/ARF*-Defekten von Schmitt *et al.* in Empfängermause ohne c-myc-Transgen

transplantiert und dort mittels CTX chemotherapeutisch behandelt. Wir können nicht mit völliger Sicherheit davon ausgehen, daß die sekundären Tumore der Empfänger-mäuse hinsichtlich ihres Karyotyps mit den Primärtumoren identisch waren. Diese Überprüfung war uns aus technischen Gründen nicht möglich. Dennoch sprechen die Entstehung der Sekundärtumore in nicht-transgenen Mäusen und die histopathologische Gleichheit dieser Tumore mit den primären Erkrankungen (Schmitt *et al.*, 1999) dafür, daß die Empfänger-mäuse identische Kopien der primären Lymphome entwickelten.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Remissionsdaten der Lymphome mit bestimmtem *INK4a/ARF*-Status stimmen mit früheren Berichten an größeren Stichprobenzahlen überein (Schmitt *et al.*, 2002). Während also *INK4a/ARF*-null-Tumore tragende Mäuse frühzeitige Rezidive entwickelten, waren *ARF*-defiziente, aber *INK4a*-intakte Tumore mit einer deutlich besseren Prognose verbunden. Parallel dazu wurde in humanen hämatologischen Tumoren der Verlust beider *INK4a/ARF*-Genprodukte als ein prognostischer Indikator für geringe Behandlungserfolge beschrieben (Faderl *et al.*, 2000; Carter *et al.*, 2001b).

Anhand der Kombination aus zytogenetischer Charakterisierung der Tumore und der Erhebung von Therapiedaten wurden chromosomale Aberrationen mit prognostischer Relevanz identifiziert. Wir beschrieben den Gewinn des Chromosoms 6 als assoziiert mit einer verminderten und den Gewinn des Chromosoms 14 verbunden mit einer gesteigerten Therapierbarkeit speziell in *ARF*-defizienten, *INK4a*-intakten *c-myc*-aktivierten Maus-Lymphomen. Da für diesen Genotyp bisher noch keine Marker mit prognostischer Relevanz beschrieben wurden, wählten wir für unsere Untersuchungen molekular-zytogenetische Methoden zur Analyse des gesamten Genoms. Ein unumgängliches Problem dabei war die begrenzte Auflösung dieser Methoden, die ein eventuelles Auftreten von Deletionen oder Gewinnen kleiner Regionen (zum Beispiel des relevanten Locus bzw. Gens auf Chromosom 14), sowie Punktmutationen und extragenische Veränderungen nicht zeigen können. Dennoch, durch den Vergleich der zytogenetischen Charakterisierung von Tumoren zum Zeitpunkt der Diagnose mit dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie, konnten wir aufzeigen, daß zusätzliche genetische Informationen in Verbindung mit etablierten prognostischen Markern, wie in diesem Fall der Verlust der *INK4a*-Funktion, die Vorhersagen über den Erfolg der Krebstherapie stärken können.

Zum Beispiel korrelierte der Gewinn von Chromosom 14 innerhalb der *ARF*-null-Lymphomgruppe mit einem dramatischen Unterschied im Remissionsverhalten nach der Chemotherapie. Es scheint, als ob der Zugewinn von Chromosom 14 in *ARF*-null-Lymphomen die Fähigkeit bewahrt, erfolgreich medikamentös behandelt zu werden, eine Fähigkeit, die offensichtlich *INK4a/ARF*-null-Lymphomen verlorengegangen ist. Ein Zugewinn von Chromosom 6 bewirkt hingegen bei *ARF*-null-Lymphomen Chemo-resistenz bis hin zu dem Grad, welcher der bekannten Medikamenteninsensitivität von *INK4a/ARF*-null-Lymphomen gleicht.

Für *ARF*-defiziente, *INK4a*-intakte *c-myc*-aktivierte Lymphome wurden also der Gewinn des Chromosoms 14 als Marker für gesteigerte Behandlungserfolge und der Gewinn des Chromosoms 6 als Marker für verminderte Therapierbarkeit mittels CTX gefunden.

Ogleich Erkenntnisse über individuelle Mutationen und chromosomale Alterationen nicht ohne weiteres von einer Spezies auf eine andere übertragbar sind, so gelten doch die hier zu Grunde liegenden generellen Prinzipien wahrscheinlich für Mäuse und Menschen

gleichermaßen und werden für das Verstehen der genetischen Kontrolle von Krebs und Krebstherapie von Bedeutung sein.

Im menschlichen Genom lokalisieren die syntenischen Regionen zum Maus-Chromosom 14 auf den Chromosomenarmen 3p, 6p, 8p, 10q, 13q und 14q und die syntenischen Regionen zum Maus-Chromosom 6 auf den Chromosomenarmen 1p, 2p, 3p, 3q, 4q, 7p, 7q, 10q, 12p und 22q (<http://www.ensembl.org/>). Um die relevanten Zielregionen einzuengen, suchten wir in humanen Tumoren mit vergleichbaren genetischen Defekten nach bereits beschriebenen Alterationen mit prognostischer Relevanz. Von besonderer Bedeutung waren dabei Burkitt-Lymphome, welche sich, ähnlich wie das hier verwendete Mausmodell, durch ein aktiviertes *c-myc*-Gen auszeichnen. In 90% der untersuchten Burkitt-Lymphom-Zelllinien und in 42% der Biopsien wurde ein Verlust der INK4a-Proteinexpression, ausgelöst sowohl durch Deletionen, vor allem aber durch Promotorhypermethylierung, gefunden (Klangby *et al.*, 1998). Allerdings wurden Burkitt-Lymphome bisher nicht gezielt auf Mutationen in *ARF* untersucht. Da also keine *ARF*-defizienten, INK4a-intakten Burkitt-Lymphome beschrieben wurden, und diese nur eine kleine Minderheit innerhalb der Burkitt-Lymphome darstellen können, verzichteten wir auf die Suche von beschriebenen Gewinnen chromosomalen Materials in Burkitt-Lymphomen.

Andere humane Tumore mit entweder bekanntem INK4a/*ARF*- oder *c-myc*-Status wurden zytogenetisch nicht untersucht. Auch wurden in solchen Tumoren bisher keine Gene/Proteine mit prognostischer Bedeutung beschrieben.

Jedoch wurde in kindlicher Akuter Lymphoblastischer Leukämie (ALL) - für diesen Tumortyp wurden *ARF*-spezifische Deletionen beschrieben (Bertin *et al.*, 2003) - der Gewinn des kompletten Chromosoms 10 signifikant korrelierend mit Tumor-freiem Überleben gefunden (Moorman *et al.*, 2003). Daher sind die Regionen 10q11.2 und 10q22.2-q23.2, welche zum Mausechromosom 14 syntenisch sind, von besonderer Bedeutung bei der Suche nach Faktoren mit prognostischer Relevanz.

In den hier untersuchten *c-myc*-aktivierten Maus-Lymphomen wurden vorwiegend Gewinne ganzer Chromosomen beobachtet. Innerhalb der *ARF*null-Lymphome war der Zugewinn des Chromosoms 6 mit dramatisch verkürzten Remissionszeiten, der Zugewinn von Chromosom 14 dagegen mit einer sehr guten Therapierbarkeit verbunden. Vergleiche mit bekannten Aberrationen humaner Tumore erlaubten nicht, Kandidatengene in den Therapie-relevanten Regionen der Maus-Chromosomen 6 und 14 zu bestimmen. Weitere umfangreiche Untersuchungen sind erforderlich, um die jeweiligen Gene/Proteine zu identifizieren, welche für den Erfolg der Chemotherapie relevant sind. Zukünftige Studien, zum Beispiel an humanen *ARF*-defizienten, INK4a-intakten Tumoren, sollen zur Beantwortung dieser Fragestellung beitragen.

5.2 Translokationen an 5E5/F wurden nicht durch ein häufiges CFS verursacht

Anders als wir aufgrund der Erkenntnisse an menschlichen Lymphomen erwarteten, traten nur wenige Chromosomentranslokationen in den Tumoren des Mausmodells auf.

Die einzige mehrfach beobachtete strukturelle Aberration war eine Translokation 5E5/F mit verschiedenen Partnerchromosomen.

Mit Hilfe der FISH-Analyse gelang uns die Einengung des rekurrenten Translokationsbruchpunktes in 5E5/F in einen Bereich mit Homologie zur humanen Chromosomenbande 12q24.1. Da die Translokation an 5E5/F mit großer Häufigkeit auch in einem Mauslymphom-Modell mit c-myc-aktivierender Translokation, aber ohne gezielte Defekte in *INK4a/ARF* gefunden wurde (Coleman *et al.*, 2000), suchten wir nach bereits beschriebenen humanen c-myc-aktivierten Tumoren mit Translokationen an 12q24. Wie in Kapitel 5.1.2 dargelegt, zeichnen sich Burkitt-Lymphome durch c-myc-aktivierende Translokationen aus. Dennoch fanden wir unter den 324 zytogenetisch charakterisierten Burkitt-Lymphomen, zusammengefaßt in der Mitelman-Datenbank (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/AbnCytSearchForm>), keines mit einer Translokation an 12q24. Jedoch wurden 21 Fälle mit einem Gewinn des gesamten Chromosoms 12 beschrieben. Die humane Chromosomenbande 12q24.1 trägt demnach ein Gen, dessen Zugewinn in Kooperation mit aktiviertem c-myc im Prozeß der Tumorentstehung von Bedeutung ist.

Da die Annahme besteht, daß rekurrente chromosomale Umbauten auf eine erhöhte Brüchigkeit der DNA an CFSs zurückzuführen sind, untersuchten wir die CFS-Expression der Bruchpunktregion in 5E5/F. Unsere Ergebnisse belegten eine geringe bis sehr geringe CFS-Expressionshäufigkeit im Bereich des Translokationsbruchpunktes. Daher ist das wiederholte Auftreten der Aberration in mehreren Tumoren weniger auf eine erhöhte Instabilität als vielmehr auf die Einbezogenheit eines tumorrelevanten Gens zurückzuführen. Inwiefern CFSs bei der Entstehung von Tumor-relevanten chromosomalen Umbauten von Bedeutung sind, bleibt weiterhin unbeantwortet.

5.3 Die CFS-Expressionshäufigkeiten von Chromosomenbanden sind evolutionär konserviert

Ein Ziel der Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob CFSs evolutionär konservierte Strukturen darstellen. Zur Beantwortung dieser Frage verglichen wir die CFS-Expression zweier Labor-Mausstämme miteinander und mit Kartierungsdaten aus menschlichen Zellen. Dafür analysierten wir die APC-induzierte und spontane CFS-Expression in B- und T-Lymphozyten der Mausstämme BALB/c und C57BL/6. Die detaillierten CFS-Kartierungsdaten machten wir über die Internetseite der Klinischen Genetik der TU Dresden (<http://www.tu-dresden.de/medgen/>) erhältlich. Damit ermöglichten wir erstmals den öffentlichen Zugang zu genomweiten CFS-Expressionshäufigkeiten in der Maus.

Zunächst wurden die mittleren Häufigkeiten der CFS-Expression pro Zelle zwischen BALB/c- und C57BL/6-Mäusen verglichen. Die Zellen ohne APC-Induktion bildeten Chromatinlücken, partielle Deletionen und Translokationen in beiden Mausstämmen gleichfalls als seltene Ereignisse. In ihrer Häufigkeit von 0,16 und 0,28 Aberrationen pro Metaphase entsprach diese spontane Brüchigkeit bereits veröffentlichten Kontrolldaten aus

anderen Zelltypen und anderen Mausstämmen: Für unbehandelte C57BL/6- und BALB/c-Epithelzellen wurden 0,13-0,27 (Ponnaiya *et al.*, 1997), und für Fibroblasten-artige Zellen von RBC/Dn- und AEJ/GnRk-Mäusen 0,07 und 0,30 Aberrationen pro Zelle beschrieben (Sanz *et al.*, 1986).

Unter dem Einfluß von APC stellten wir eine erhöhte generelle CFS-Expression in den Zellen der BALB/c- gegenüber den C57BL/6-Mäusen fest. Möglicherweise steht das Ergebnis in Zusammenhang mit dem deutlich höheren bestrahlungsbedingten Risiko für Brustkrebs innerhalb des BALB/c-Stammes im Vergleich zu C57BL/6 oder anderen Mausstämmen (Storer *et al.*, 1988). Dieses beruht auf BALB/c-Stamm-spezifischen Polymorphismen in der kodierenden Region des *Prkdc*-Gens, dessen Produkt, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, an der DNA-Doppelstrang-Bruch-Reparatur beteiligt ist (Yu *et al.*, 2001). *In vivo* und *in vitro* Bestrahlungsexperimente an Brustepithelzellen belegten eine deutlich erhöhte Anzahl an Chromatinlücken und anderen chromosomalen Aberrationen in BALB/c- gegenüber C57BL/6-Zellen bereits nach wenigen Zellpassagen (Ponnaiya *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2001). Da Defekte in verschiedenen Reparaturmechanismen die Expression von CFSs verstärken (Turner *et al.*, 2002), könnte die BALB/c-spezifische *Prkdc*-Funktionsminderung die Grundlage für die erhöhte Anzahl von APC-induzierten CFSs bilden.

Wir untersuchten weiterhin die Konservierung der CFS-Expressionshäufigkeiten der einzelnen Chromosomenbanden zwischen den beiden analysierten Mausstämmen. Trotz der unterschiedlichen Sensitivitäten gegenüber APC zeigten BALB/c und C57BL/6 einen hohen Grad an Konservierung der Banden-spezifischen relativen CFS-Expressionshäufigkeiten. Die Stamm-übergreifende Konservierung von CFSs wurde darüberhinaus in einem Vergleich unserer Kartierungsergebnisse mit veröffentlichten Daten über APC-behandelte Lymphozyten von ICR-Mäusen (Elder & Robinson, 1989) bestätigt. Elder *et al.* benannten 19 Banden als CFS, basierend auf deren signifikant erhöhten Expression. 13 Banden aus dieser Liste zählten unter den gleichen Signifikanzbedingungen aufgrund unserer Daten ebenfalls als CFS. Vier weitere der 19 Banden wurden in unserer Studie überdurchschnittlich häufig exprimiert (> 0,5% der Gesamtzahl an Läsionen) gefunden. Eine der übrigen beiden Banden, 14E5, ist ein Giemsa-negatives Telomer. In solchen Regionen sind Lücken und Brüche schwer zu erkennen. Fra15B2 könnte möglicherweise ein ICR-spezifisches CFS darstellen.

Zwei weitere Veröffentlichungen beschrieben die CFS-Expression in Mäusen. Da aber beide Arbeiten an Fibroblasten (Djalali *et al.*, 1987) bzw. Fibroblasten-artigen Zellen (Sanz *et al.*, 1986) durchgeführt wurden, ist ein Vergleich dieser Daten mit den von uns an Lymphozyten erhobenen Ergebnissen problematisch. Dennoch zeigen die Vergleiche zwischen BALB/c, C57BL/6 und ICR-Mäusen eine starke Konservierung der CFS-Expressionshäufigkeiten zwischen unterschiedlichen Mausstämmen, welche zwar in ihrer genomischen Sequenz nicht genau übereinstimmen, aber dennoch einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen. Inwieweit CFSs über größere evolutionäre Distanzen konserviert wurden, wird in einem der folgenden Punkte diskutiert.

Auffällig war eine deutliche Abgrenzung der murinen Zentromerbanden gegenüber den nicht-Zentromerbanden bei der Expression von CFSs. Die Zentromere der Mausechromosomen, welche große Bereiche hoch repetitiver DNA darstellen, zeigten eine signifikant höhere Anzahl spontaner Läsionen und unter dem Einfluß von APC keine signifikante Steigerung der CFS-Häufigkeit. Die Brüchigkeit an den Zentromeren der

Maus-Chromosomen wird also durch einen spezifischen, APC-insensitiven Mechanismus bewirkt.

Um zu prüfen, ob APC-induzierte CFSs ein sichtbares Abbild von instabilen genomischen Regionen normaler Zellen darstellen, klassifizierten wir die Banden der seltenen spontanen Läsionen entsprechend ihrer APC-induzierten CFS-Expressionshäufigkeiten. Dazu errechneten wir basierend auf den CFS-Kartierungsdaten unter Berücksichtigung der Bandengrößen extrem fragile, mittel fragile und stabile Chromosomenbanden. Alle spontanen Chromatinlücken und Doppelstrangbrüche in nicht-Zentromerbanden traten in extrem fragilen und mittel fragilen, bevorzugt aber in extrem fragilen Banden auf. In stabilen nichtzentromerischen Banden wurden hingegen keine spontanen Läsionen gefunden. Zudem entsprachen sich die CFS-Expressionsmuster der Zellen, welche unterschiedlichen APC-Konzentrationen ausgesetzt waren. Aus diesen Ergebnissen zogen wir den Schluß, daß CFSs unter nativen Bedingungen instabile Regionen darstellen, deren Brüchigkeit durch APC verstärkt wird.

Der molekulare Mechanismus für die bevorzugte Ausbildung der CFSs in spezifischen chromosomalen Regionen wird häufig in der DNA-Sequenz vermutet. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Variation der CFS-Expressionshäufigkeiten innerhalb der gleichen chromosomalen Banden zwischen verschiedenen Personen (Denison *et al.*, 2003b und Karen Stout-Weider, persönliche Mitteilung). Anders als Menschen zeichnen sich Labormausstämme durch genomische Sequenzidentitäten von nahezu 100% aus, da sie durch fortlaufende Vermehrung innerhalb naher Verwandtschaftsgrade gezüchtet wurden. Wir verglichen in dieser Arbeit die Variationshöhe der CFS-Expression, ausgedrückt als CV-Werte, innerhalb der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 und zwischen genetisch variablen Menschen (humane CFS-Kartierungsdaten von Karen Stout-Weider). Der durchschnittliche CV-Wert der Maus-Chromosomenbanden lag über dem durchschnittlichen CV-Wert einer Bande des humanen Genoms. Somit wurde eindeutig belegt, daß interindividuelle Sequenzpolymorphismen nicht die Ursache für variierende CFS-Expressionshäufigkeiten bilden. Der molekulare Mechanismus der CFS-Expression ist unabhängig von interindividuellen Varianzen in der DNA-Sequenz.

Weiterhin nutzten wir den Zugang zu CFS-Kartierungsdaten von Maus und Mensch, um den Grad der Konservierung der CFS-Expressionshäufigkeiten über 92 Mio. Jahre Evolution hinweg, welche uns Menschen von den Mäusen trennen, zu untersuchen. Der Vergleich der CFS-Expressionshäufigkeiten zeigte eine signifikante Korrelation zwischen den 77 homologen Chromosomenbandenpaaren aus 17 Segmenten ohne Synteniebruch zwischen Maus und Mensch. Ein nicht zu vernachlässigendes Problem bei dieser Analyse ist, daß die CFS-Kartierungsdaten für den Menschen auf Studien an T-Lymphozyten, die Daten für die Maus auf Untersuchungen an B- und T-Lymphozyten basieren. Durch die hohe Ähnlichkeit des CFS-Expressionsmusters der beiden Zelltypen ist dennoch eine hohe Übereinstimmung der Banden-spezifischen Häufigkeiten und damit die CFS-Konservierung zwischen Mensch und Maus erkennbar.

Bereits in den Genomen verschiedener Menschenaffenarten wurde ein Großteil der häufig beobachteten humanen CFSs ebenfalls häufig exprimiert gefunden (Yunis & Soreng, 1984; Smeets & van de Klundert, 1990). Wir zeigten hier, daß die evolutionäre CFS-Konservierung auch über weiter entfernte Arten besteht und zudem gleichermaßen Banden mit hohen und geringen CFS-Expressionshäufigkeiten betrifft. Daher stellt die Tendenz zur CFS-Expression ein spezifisches Merkmal jedes chromosomalen Abschnittes dar, welches im Prozeß der Evolution in hohem Maße erhalten blieb.

5.4 CFSs des menschlichen Chromosoms 7 kartieren nicht bevorzugt in Bruchpunkt-„hot spots“

Ein weiteres Ziel unserer Arbeit bestand darin, die öffentlich zugänglichen Daten über chromosomale Bruchpunkte aus Erkrankungen des Menschen zu nutzen, um Bandenspezifische CFS-Expressionshäufigkeiten mit der Häufigkeit von klinisch relevanten Bruchereignissen zu vergleichen. Darüberhinaus wurden Regionen von molekular-zytogenetisch kartierten CFSs bezüglich ihres Vorkommens von Bruchereignissen untersucht. Wir konzentrierten unsere Analysen auf das menschliche Chromosom 7, da hierfür sowohl eine Zusammenstellung von bekannten Aberrationen in malignen und nicht-malignen Erkrankungen, als auch segmentale genomische Duplikationen als Zeichen evolutionärer Bruchereignisse zur Verfügung standen. Bereits vier CFSs des Chromosoms 7 waren molekular-zytogenetisch charakterisiert. Um das Wissen der genauen Positionen von CFSs weiter auszubauen, lokalisierten wir mit Hilfe der FISH-Technik die CFS-Expression in 7q31, der Bande mit der zweithöchsten CFS-Expressionshäufigkeit des Chromosoms 7 in Lymphozyten-Metaphasen.

Durch den kombinierten Einsatz mehrerer Hybridisierungsproben gelang es uns, die Positionen fast aller APC-induzierten Chromatinlücken und Doppelstrangbrüche in 7q31 auf Bereiche von weniger als 100 kb einzugrenzen. Auf diese Weise charakterisierten wir FRA7K, sein Epizentrum und die genauen Grenzen. Molekular-zytogenetische Kartierungen von CFSs in 7q31 wurden bereits im Jahr 1998 von Huang *et al.* durchgeführt. Die Autoren verwendeten dafür eine Mensch / Hamster-hybride Zelllinie und beschrieben FRA7G, ohne die Positionen der einzelnen APC-induzierten Läsionen anzugeben (Huang *et al.*, 1998a). Hellman *et al.* veröffentlichten einige Jahre später genauere FISH-Ergebnisse unter Verwendung einer Lymphozyten-Zelllinie mit zwei zusätzlichen Chromosomen 7 (Hellman *et al.*, 2002). Die Daten sind in Abbildung 5.4 den Ergebnissen unserer Arbeit gegenübergestellt. Sie stimmen - ausgenommen die Angaben für die Probe AC003080, welche dem hier verwendeten BAC RP11-80N18 entspricht - mit unseren Beobachtungen überein. Vermutlich hat eine fehlerhafte Positionsangabe von AC003080 auf der Chromosom 7-Sequenz oder eine Verunreinigung des BAC-Stocks mit einem anderen BAC zu der Abweichung beigetragen. Basierend auf den Kartierungsdaten von Stout-Weider *et al.* zählt 7q31 zu den 10 am häufigsten CFS-exprimierenden Banden in humanen T-Lymphozyten. Wir haben in dieser Arbeit gezeigt, daß FRA7K 0,6 Mb genomische Region umfaßt und extrem fragil ist, wohingegen FRA7G eine Ausdehnung von 4 Mb erreicht und mit deutlich geringerer Häufigkeit exprimiert wird. In Chromosom 7 sind nunmehr fünf CFSs molekular-zytogenetisch kartiert.

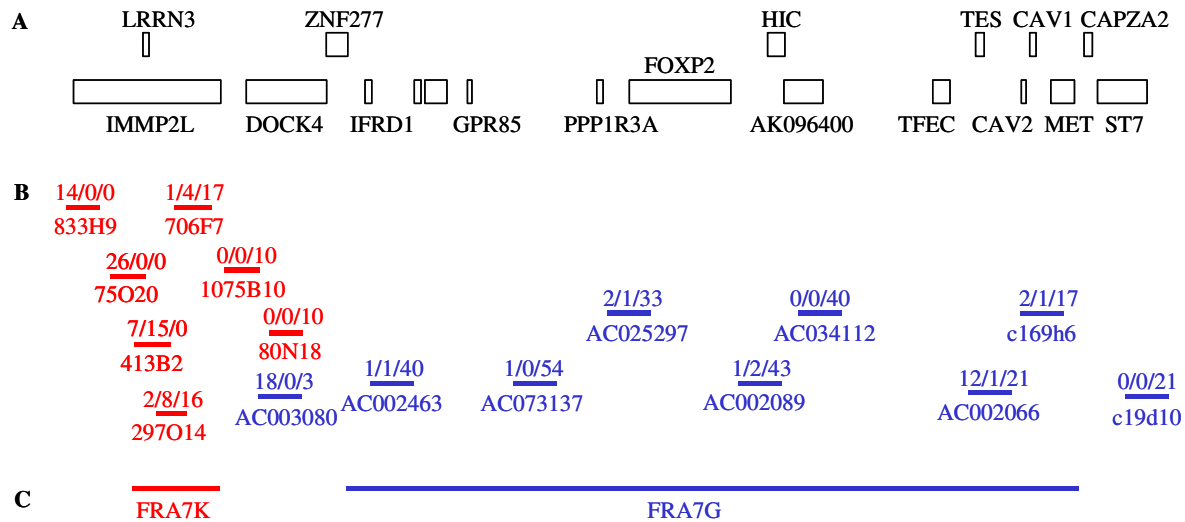


Abbildung 5.4 Ergebnisse der molekular-zytogenetischen Untersuchungen von CFSs in 7q31. (A): Bekannte Gene in der analysierten Region. (B): BAC-Sonden und die Anzahl ihrer Signale zentromerisch zum CFS / das CFS überspannend / telomerisch zum CFS. In rot sind die Ergebnisse dieser Arbeit und in blau die Ergebnisse von Hellman *et al.*, 2002 gezeigt. Unsere CFS-Kartierung stimmt - ausgenommen die Daten für die Probe AC003080, welche dem hier verwendeten BAC RP11-80N18 entspricht - mit den Beobachtungen von Hellman *et al.* überein.

Wir stellten die CFS-Expressionshäufigkeiten der Banden des Chromosoms 7, basierend auf der Kartierungsstudie an T-Lymphozyten von Stout-Weider *et al.*, der jeweiligen Anzahl beschriebener Bruchereignisse in malignen und nicht-malignen Erkrankungen gegenüber und untersuchten so die viel diskutierte Überlagerung von CFSs mit klinisch relevanten Bruchpunkten. Weder die Bruchpunkthäufigkeiten maligner Zellen noch die der Zellen nicht-maligner Erkrankungen waren proportional zu den CFS-Expressionshäufigkeiten. Das gleiche Ergebnis wurde bei der Einschränkung des Vergleichs auf die Bruchpunkthäufigkeiten speziell lymphoblastoider Tumorzellen erzielt. Somit ist das verschieden häufige Auffinden von karyotypischen Veränderungen nicht allein durch die Expressionshäufigkeit von CFSs im Genom erklärbar. Dennoch wurde die bevorzugte Einbeziehung von CFSs in chromosomale Umbauten durch zwei verschiedene zytogenetische Studien gezeigt. So beobachteten Glover *et al.* häufige Schwesterchromatid-Austausche an APC-induzierten CFSs (Glover & Stein, 1987). Carme *et al.* zeigten, daß APC-behandelte Lymphozyten nach einem weiteren Zellzyklus in APC-freiem Medium Deletionen, Inversionen und Translokationen aufwiesen, deren Bruchpunkte zur Mehrzahl in Banden mit erhöhter CFS-Expression kartierten (Carme *et al.*, 1999). Bei der Auswertung unserer Ergebnisse muß beachtet werden, daß der Prozeß der Selektion entscheidet, ob eine Zelle mit einer bestimmten Aberration überlebensfähig ist, einen Wachstumsvorteil erzielt oder abstirbt. Als karyotypische Veränderungen in Tumorzellen wird somit nur ein kleiner Teil der initialen DNA-Brüche detektiert.

Anhand des BFB-Modells (siehe Kapitel 1.3.1) wurde den CFSs eine Bedeutung bei intrachromosomalen Genamplifikationen zugeschrieben. So lokalisierten Coquelle *et al.* die Grenzen einer Chemikalien-induzierten Amplifikation in einer Hamster-Zelllinie zytogenetisch übereinstimmend mit einem häufig exprimierten CFS (Coquelle *et al.*, 1997). Darüberhinaus wurden Amplikongrenzen in zwei humanen Karzinom-Zelllinien

innerhalb der Regionen molekular-zytogenetisch charakterisierter CFSs beschrieben (Ciullo *et al.*, 2002; Hellman *et al.*, 2002). Aus diesen Beobachtungen begründet sich die Hypothese, wonach CFS eine Rolle bei der Amplifikation von Onkogenen im neoplastischen Prozeß einnehmen. In dieser Arbeit überprüften wir diesen Verdacht für eine Amplifikation auf dem Chromosomenarm 7q. Die humane Brustkrebszelllinie SKBR3 war von Matthäi *et al.* mittels Array-CGH analysiert worden. Das Profil des Chromosoms 7 (dargestellt in Abbildung 4.4.2(B)) entspricht dem kürzlich veröffentlichten Ergebnis aus Snijders *et al.*, 2003. Wir kartierten mittels FISH-Analysen die proximalen und distalen Bruchpunkte des Amplikons in FRA7G und in das Epizentrum von FRA7H. Somit liegen beide Grenzen des 7q-Amplikons von SKBR3 in einem CFS. Die Fragilität an FRA7G und FRA7H könnte daher die Aberration der Tumorzelllinie, entstanden möglicherweise durch den BFB-Mechanismus, ausgelöst haben.

Um zu testen, inwiefern CFSs am Prozeß der Karyotypevolution beteiligt waren, verglichen wir die Banden-spezifischen CFS-Expressionshäufigkeiten und die Bereiche der fünf molekular-zytogenetisch charakterisierten CFSs in 7q mit Regionen evolutionärer chromosomaler Umbauten. Als Spuren solcher Veränderungen wurden i) Synteniebrüche zu den Genomen von Tieren mit verfügbaren Sequenzanalysen und ii) segmentale Duplikationen im humanen Genom genutzt. Unsere Untersuchungen zeigten, daß weder die Randstellen syntenischer Regionen noch die segmentalen Duplikationen bevorzugt in CFSs lagen. Die Mehrheit der segmentalen Duplikationen wurde in Klustern innerhalb von R-Banden, speziell in Zentromernähe, gefunden. Das verstärkte Auftreten von segmentalen Duplikationen in den perizentromerischen Regionen ist nicht auf das Chromosom 7 beschränkt sondern stellt vielmehr ein generelles Phänomen im humanen Genom dar (Bailey *et al.*, 2001). Eichler *et al.* vermuteten die Eingebundenheit von Repeats mit hohem GC-Gehalt, welche sie an den Randstellen von segmentalen Regionen fanden, bei der Entstehung von evolutionären Duplikationen (Eichler *et al.*, 1999). Wahrscheinlich bewirken diese (perizentromerischen) GC-reichen repetitiven Sequenzen, nicht aber CFSs, das Auftreten von segmentalen Duplikationen. Aus der Summe der Beobachtungen vermuten wir, daß der Mechanismus, welcher die Evolution der Chromosomen bewirkt, unabhängig von der Instabilität an CFSs ist.

5.5 Die bisher untersuchten CFSs sind auf molekularer Ebene zwischen Maus und Mensch konserviert

Aufbauend auf der Beobachtung, daß die CFS-Expressionshäufigkeiten ganzer Chromosomenbanden zwischen Mensch und Maus übereinstimmen, untersuchten wir die Konservierung von CFS-exprimierenden Regionen mit molekular-zytogenetischen Methoden. DNA-Sonden, die homologe Maus-Sequenzen zu fünf humanen CFSs repräsentieren, wurden auf APC-behandelte Maus-Lymphozytenmetaphasen hybridisiert. Dabei wurden die Positionen der Chromatinlücken und Chromosomenbrüche in den jeweiligen Banden relativ zu den DNA-Proben identifiziert. Die homologen Sequenzen aller fünf analysierten humanen CFSs exprimierten im Genom der Maus ebenfalls CFSs. Wir zeigten somit die molekulare Konservierung dieser CFSs. Drei weitere Mensch / Maus

homologe CFSs wurden auf die gleiche Weise von Glover *et al.*, 1998 (FRA3B / Fra14A2), Krummel *et al.*, 2002 (FRA16D / Fra8E1) und Rozier *et al.*, 2004 (FRA4F / Fra6C1) beschrieben, so daß insgesamt acht von acht untersuchten CFSs-Regionen zwischen den beiden Spezies konserviert sind.

Trotz der Kartierung humaner CFSs in T-Lymphozyten und der murinen CFSs in B- und T-Lymphozyten errechneten wir mittels der Korrelationsanalyse einen signifikanten Zusammenhang der CFS-Expressionshäufigkeiten zwischen den homologen Banden der acht CFS-Paare. Dabei muß bedacht werden, daß für die Mehrzahl der molekular charakterisierten CFSs keine absoluten Grenzen festgelegt werden konnten und daß sich die Häufigkeitsangaben jeweils auf eine ganze Bande beziehen. Diese wurden zumeist im Laufe der Evolution in strukturelle Umbauten involviert. Ein solcher Synteniebruch kann beispielsweise eine Erklärung für die Verschiebung des Epizentrums in FRA9E gegenüber Fra4C2 bilden.

Dennoch, der hohe Grad an Konservierung der CFS-exprimierenden DNA-Abschnitte und deren Expressionshäufigkeiten läßt auf eine biologische Relevanz der Strukturen bzw. Mechanismen schließen, welche die Fragilität der CFSs bewirken.

5.6 Spezifische Eigenschaften grenzen CFSs von stabilen Regionen ab

Ausgehend von den Sequenzen der 13 bekannten menschlichen CFSs und dem Wissen um acht zwischen Mensch und Maus konservierte CFSs wurde untersucht, ob i) chromosomale Umbauten, entgegen den Ergebnissen an den CFSs des humanen Chromosoms 7, während der Evolution vermehrt in Regionen von CFSs stattfanden und ob ii) CFSs spezifische konservierte Eigenschaften aufweisen, welche sie von stabilen Kontrollregionen unterscheiden.

Die mögliche Beteiligung von CFSs an der Karyotypevolution wurde in zwei methodischen Ansätzen untersucht:

Erstens verglichen wir die Häufigkeiten von Mensch / Maus-Synteniebrüchen in CFSs mit denen in stabilen Chromosomenbanden. Dieser Vergleich zeigte sowohl für den Menschen, als auch für die Maus in den CFS-Regionen weniger Synteniebrüche als in stabilen Kontrollregionen.

Zweitens analysierten wir Regionen mit überdurchschnittlich vielen Synteniebrüchen bezüglich ihrer CFS-Expression. Dafür wurden neun Bereiche im Mausgenom identifiziert, welche innerhalb eines Abschnittes (3 Mb – entspricht ungefähr der Größe eines CFS) mehrere Synteniebrüche zu den sequenzierten Genomen von Mensch (≥ 2) und Ratte (≥ 1) enthielten. Von diesen neun evolutionär extrem instabilen Regionen wurden drei mit einer erhöhten CFS-Expressionshäufigkeit der betroffenen Chromosomenbanden im Vergleich zum Mittel über alle Banden des Mausgenoms ausgewählt und mittels FISH-Analysen hinsichtlich ihrer CFS-Expression untersucht. Dabei ermittelten wir jeweils geringe CFS-Expressionshäufigkeiten in den Bereichen der Synteniebrüche.

Beide experimentellen Ansätze zeigten, daß es keinen Zusammenhang zwischen der CFS-Expression einer Region und ihrer Anzahl an Synteniebrüchen gibt. Dies spricht offensichtlich gegen die Theorie, wonach chromosomale Umbauten im Zuge der Evolution

bevorzugt als Folge von Brüchen an CFSs stattfanden. Es ist allerdings auch denkbar, daß Synteniebrüche in CFS-Regionen erfolgten und dabei deren CFS-Expressionshäufigkeiten herabsetzten.

Weiterhin nutzten wir die Kenntnis der genauen CFS- bzw. Kontrollsequenzen, um den molekularen Mechanismus der CFS-Expression näher zu untersuchen. Obwohl Regionen erhöhter DNA-Helix-Flexibilität als charakteristisches Merkmal in den Abschnitten aller bisher untersuchten CFSs beschrieben wurden (Mishmar *et al.*, 1998; Zlotorynski *et al.*, 2003; Rozier *et al.*, 2004), fanden wir sowohl in der Maus als auch im Menschen vergleichbare Häufigkeiten von Inseln mit signifikant erhöhter Flexibilität und deren Kluster in CFSs und stabilen Kontrollregionen. Dabei muß beachtet werden, daß die Flexibilitätswerte der Maus aufgrund von Lücken in den zur Verfügung stehenden Maussequenzen Ungenauigkeiten enthalten können. Die Sequenzlücken befinden sich aber gleichermaßen in CFS- und Kontrollregionen, weshalb höhere Flexibilitätswerte in CFSs auch für die Maus mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden können. Eine weitere Beobachtung, welche gegen eine Beteiligung der DNA-Helix-Flexibilität am molekularen Mechanismus der CFS-Entstehung spricht, war, daß die Zahl der Flexibilitätsinseln nicht mit der Expressionshäufigkeit der CFSs korrelierte.

Die Grundlage für die Berechnung der Flexibilitätswerte bildet die Anzahl von A/T-Dinukleotiden im jeweils analysierten Sequenzfenster. Hohe Anteile an A/T-Basenfolgen und damit hohe DNA-Helix-Flexibilitäten sind Merkmale verschiedener repetitiver Sequenzen. Da diese im Prozeß der Evolution starken Veränderungen unterliegen, ist es wenig erstaunlich, daß die Positionen der Flexibilitäts-Inseln zwischen Maus und Mensch nicht konserviert gefunden wurden.

Eine gesteigerte DNA-Helix-Flexibilität hat offenbar keine Bedeutung bei der Entstehung von CFSs. Eine Reihe von Beobachtungen lassen vielmehr vermuten, daß die Grundlage für CFSs nicht in der DNA-Sequenz *per se* zu suchen ist. So liegt die interindividuelle Variation der CFS-Expressionshäufigkeit bestimmter Chromosomenbanden (ausgedrückt als mittlerer CV-Wert aus der Gesamtheit der Banden) im Menschen nicht über der von Labor-Mäusen mit Sequenzidentitäten von annähernd 100%. Zudem deutet die Gewebespezifität der CFSs-Expressionsmuster auf eine ursächliche Beteiligung von Genaktivitäten bei der Ausbildung von CFSs hin (Morgan *et al.*, 1988; Murano *et al.*, 1989b; Simonic & Gericke, 1996).

Dies veranlaßte uns, die Gene der CFSs zu betrachten. Dabei stellten wir, ebenso wie kürzlich von Rozier *et al.* erwähnt (Rozier *et al.*, 2004), fest, daß einige der molekularzytogenetisch charakterisierten CFSs große Gene überspannen. Solche großen Gene, deren Exons sich über mehr als 650 kb erstrecken, wurden in den Regionen der CFSs deutlich öfter gefunden als in stabilen Kontrollregionen. Besonders die Epizentren der häufigen CFSs lokalisierten in großen Genen. Die einzige Ausnahme bildete hierbei FRAXB. Möglicherweise blieb ein großes Gen innerhalb der Region bisher unentdeckt.

In ihrer Funktion reichen die Produkte der großen Gene in CFSs von Neurotransmitterrezeptoren (GRID2) und Mediatoren der Zell-Zell-Interaktion im Nervensystem (CNTNAP2 und SEC8) bis zu Degradations-Proteinen (PARK2) und Zellzyklusregulatoren (FHIT). FHIT, WWOX und PTPRG werden aufgrund ihres häufigen Funktionsverlustes in Tumoren als Tumorsuppressorproteine diskutiert. Die Funktion von IMMP2L ist bisher noch unbekannt. Da die Proteine sehr unterschiedliche zelluläre

Aufgaben erfüllen, suchten wir an anderer Stelle nach einer funktionellen Verbindung zwischen den acht großen CFS-Genen.

Basierend auf den bekannten gewebsspezifischen Unterschieden der CFS-Ausbildung waren wir daran interessiert, die transkriptionelle Aktivität der Gene mit dem Vorkommen von CFSs zu vergleichen. Wir nutzten hierzu bisher unveröffentlichte und veröffentlichte CFS-Kartierungsstudien an T-Lymphozyten, Hautfibroblasten, Amniozyten und Knochenmarkzellen, sowie öffentlich zugängliche Ergebnisse von RNA-Expressions-Arrays. Da für Haut-Fibroblasten und Amnionzellen keine spezifischen Array-Daten vorhanden waren, verglichen wir hier die CFS-Häufigkeiten mit den RNA-Expressionsdaten der jeweils übergeordneten Gewebe Haut und Plazenta. In den vier untersuchten Zelltypen wurden für die großen Gene der CFSs zumeist RNA-Expressionswerte über 300 gefunden, was auf eine transkriptionelle Aktivität dieser Gene in den Zellen schließen läßt. Das einzige große CFS-Gen mit einem mRNA-Wert unter 300 in T-Lymphozyten war *PARK2* (218) in FRA6E, einem CFS mit geringer Häufigkeit (0,5%) in diesen Zellen. Da uns für die drei anderen Zelltypen keine detaillierten CFS-Kartierungsdaten zur Verfügung standen, sind uns Aussagen über mittel bis gering häufige CFSs in Hautfibroblasten, Amniozyten und Knochenmarkzellen nicht möglich. Im Gegensatz zu den CFSs waren die RNA-Expressionswerte der großen Gene in nicht-fragilen Kontrollregionen deutlich geringer. Diese lagen zumeist unterhalb des Grenzwertes von 100 für eine positive RNA-Expression. Eine Ausnahme bildete hier *TCBA1* in 6q22 mit einer mRNA-Expression von 250. Möglicherweise wurden seltene CFSs in dieser Chromosomenbande fälschlicherweise den benachbarten Banden 6q21 und 6q23 zugeordnet, in denen CFSs mit einer Häufigkeit von 0,6% bzw. 0,5% kartiert wurden. Da für die Erstellung der Genexpressionswerte jeweils gleiche Mengen Gesamt-mRNA des Gewebes / Zelltyps auf einen Array hybridisiert wurden, können wir die Expressionswerte verschiedener Gene innerhalb eines Gewebe- / Zelltyps direkt miteinander vergleichen. Häufige CFSs unterscheiden sich demnach klar von stabilen Kontrollregionen durch ihre Koinzidenz mit transkriptionell aktiven großen Genen.

Würde sich unter den 13 molekular-zytogenetisch charakterisierten CFSs eines mit starker Gewebs-spezifischer Varianz befinden, so könnte dies weiterhin zur Untersuchung der Relevanz von transkriptioneller Aktivität bei der Ausbildung von CFSs beitragen. Ein solches Beispiel bildet FRA7I. Seine Charakterisierung wurde an einer Fibrosarkom-Zelllinie durchgeführt und die Autoren beschrieben FRA7I mit einer Häufigkeit von 2% der Gesamtzahl APC-induzierter Läsionen in der Zelllinie. Gleichzeitig erwähnten sie sein fehlendes Auftreten in Lymphozyten aus peripherem Blut (Ciullo *et al.*, 2002). In der chromosomale Bande 7q35, in welcher FRA7I kartiert, wurden auch von Stout-Weider *et al.* in T-Lymphozyten keine CFSs gefunden. Darüberhinaus wurde 7q35 weder in Amnion- oder Knochenmarkszellen noch in Fibroblasten als CFS beschrieben. Damit übereinstimmend, lagen die *CNTNAP2*-Expressionswerte in allen vier Zelltypen kaum über dem Hintergrundwert von 100. Möglicherweise bewirkte die Expression des FRA7I-Gens *CNTNAP2* speziell in der analysierten Fibrosarkom-Zelllinie die Ausbildung des CFS.

In FRA3B weist die aus der Datenbank ermittelte transkriptionelle Aktivität von *FHIT* bei gleichzeitiger Inaktivität von *PTPRG* darauf hin, daß die Fragilität von FRA3B durch *FHIT* und nicht durch das zweite große Gen innerhalb der Bruchregion, *PTPRG*, hervorgerufen wird. Damit übereinstimmend befindet sich das FRA3B-Epizentrum in der Sequenz von *FHIT* (Wilke *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 2002).

Untersuchungen der Genaktivitäten in den Maus-CFSs waren aufgrund des Mangels an RNA-Expressionsdaten nicht möglich. Da die molekular-zytogenetisch analysierten CFSs der Maus die jeweils entsprechenden Bereiche ihrer humanen Homologen überspannen, enthalten ihre Sequenzen auch die orthologen großen Gene (siehe Tabelle 4.6.1). In Kapitel 4.5 beschrieben wir eine Korrelation der CFS-Häufigkeiten zwischen den Maus / Mensch-Homologen. Wir erwähnten auch, daß die Kartierungsdaten in der Maus an B- und T-Lymphozyten, im Menschen lediglich an induzierten T-Lymphozyten erhoben wurden. Beim Betrachten der Tabelle 4.6.1 bemerkten wir, daß einige homologe CFSs sich in ihren Häufigkeiten stark unterschieden. So bildet das häufigste humane CFS, FRA3B, 3,3% aller beobachteten CFSs. Sein Maushomolog, Fra14A2, dagegen stellte nur 1,1% der Gesamtheit der CFSs dar. Auch wenn uns keine Genexpressionsdaten für die Maus zur Verfügung standen, so interessierte uns zu untersuchen, ob Unterschiede in der transkriptionellen Aktivität des FRA3B-Gens *FHIT* zwischen B- und T-Lymphozyten die Abweichung der CFS-Häufigkeit zwischen Mensch- und Maus-Lymphozyten erklären könnten. Tatsächlich war der Expressionswert von *FHIT* in T-Lymphozyten (1000) höher als in B-Lymphozyten (300), was die höhere Häufigkeit von FRA3B gegenüber Fra14A2 verursacht haben könnte. Das zweite Beispiel für abweichende Häufigkeiten zwischen homologen CFSs bildet FRA7K (2,0%) / Fra12C1 (5,4%). Die in T-Lymphozyten geringere *IMMP2L*-Expression (513), verglichen mit der in B-Lymphozyten (925) vermag auch hier eine mögliche Erklärung zu liefern. Zwar können Beobachtungen an menschlichen Systemen nicht ohne weiteres auf die Maus übertragen werden – und umgekehrt –, die grundlegenden zellulären Mechanismen basieren aber zwischen verschiedenen Säugetierarten auf den gleichen Prinzipien. Ein Vergleich der Häufigkeiten von FRA3B und FRA7K zwischen humanen B- und T-Lymphozyten sowie *FHIT*-Genexpressionsanalysen sollten experimentell durchgeführt werden. Diese Analysen könnten unsere Hypothese überprüfen, wonach gewebsspezifisch unterschiedliche CFS-Häufigkeiten mit verschiedenen Genexpressionswerten einhergehen.

Untermauert wird die Theorie auch von der von Austin *et al.* erbrachten Beobachtung, wonach auf dem X-Chromosom weiblicher Zellen die Ausbildung von CFSs gezielt in aktiven Regionen auftritt. CFSs wurden in der Bande Xq22.1 ausschließlich im aktiven X-Chromosom gefunden. Dagegen wurden CFSs in Xp22.3, also in einer Region ohne X-Inaktivierung, in beiden homologen Chromosomen beschrieben (Austin *et al.*, 1992). Dieses Ergebnis versuchten wir anhand der Kartierungsdaten von Stout-Weider *et al.* nachzuvollziehen. Als X-chromosomale Banden mit einer CFS-Häufigkeit über 1% in 0,4 μ M APC-behandelten T-Lymphozyten wurden Xp22.3, Xp22.1, Xq12, Xq13, Xq22, Xq26 und Xq28 gelistet. Gleiche Häufigkeiten in Männern und Frauen wurden dabei für Xp22.3 und Xq12 beobachtet. Xp22.3 enthält Gene, die der X-Inaktivierung entgehen; der Status in Xq12 ist bislang weitgehend unbekannt (Strachan & Read, 1999). Für die restlichen Banden Xp22.1, Xq13, Xq22, Xq26 und Xq28 wurde in den Zellen der männlichen Probanden eine zweifach höhere CFS-Häufigkeit gegenüber den Zellen der Frauen gefunden. Diese Chromosomenbanden enthalten Gene, die in weiblichen Zellen der X-Inaktivierung unterliegen.

Die Summe unserer Beobachtungen bildet einen starken Hinweis darauf, daß die kodierenden Regionen langer transkriptionell aktiver Gene eine gemeinsame Grundlage der CFSs darstellen, wodurch sie sich von nicht-fragilen Kontrollregionen unterscheiden. Für die endgültige Bestätigung dieser Hypothese werden allerdings weitere Experimente, zum Beispiel mittels Hybridisieren von DNA-Proben aus den Bereichen langer aktiver Gene auf APC-behandelte Chromosomen, nötig sein.

Sollte sich unsere Vorstellung bestätigen, so würden die in dieser Arbeit auf der Grundlage einer CFS-Kartierungsstudie an Lymphozyten ermittelten stabilen Kontrollregionen, welche große Gene einschließen, in anderen Zelltypen durchaus CFSs bilden. Im Kapitel 4.6.2 untersuchten wir Inseln und Cluster erhöhter DNA-Helix-Flexibilität als mögliches spezifisches Merkmal von CFSs. Um Unsicherheiten bei der Wahl der Kontrollregionen als Fehlerquelle auszuschließen, wiederholten wir den Vergleich unter Ausschluß der Kontrollen mit großen Genen. Wiederholt errechneten wir mittels des Mann-Whitney U-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen CFSs und Kontrollregionen (Flexibilitäts-Inseln in G-Banden $P = 0,361$; in R-Banden $P = 0,291$; Flexibilitäts-Kluster in G-Banden $P = 0,465$; in R-Banden $P = 0,682$). Die Beobachtung, nach der eine erhöhte DNA-Helix-Flexibilität kein spezifisches Merkmal von CFSs darstellt, wurde damit bestätigt.

Unbeantwortet bleibt die Frage, warum speziell die genomischen Regionen großer transkribierter Gene häufige CFSs bilden. Eine Erklärung dafür könnte durch das Untersuchen der Chromatinstruktur erbracht werden, da stabile Regionen im Genom möglicherweise in dichter gepackter Form vorliegen als die leicht brüchigen CFS-Sequenzen.

Bis heute ist über den molekularen Mechanismus der CFS-Bildung folgendes bekannt: Die Induktion der CFSs basiert auf der Inhibition der DNA-Synthese, die *in vitro* durch Chemikalien wie APC erfolgen kann. In Anwesenheit von APC werden die Zellen in der S-Phase an der DNA-Synthese gehindert, während die anderen Zellen den G_1/S - (Pedrali-Noy *et al.*, 1981) und G_2/M -Checkpoint (Casper *et al.*, 2002) nicht überschreiten. CFSs werden aber stets an Mitosechromosomen untersucht, also in Zellen, welche den Zellzyklus fortgesetzt haben. In Übereinstimmung damit wurden Proteine mit Checkpoint-regulatorischer Funktion als essentiell für die Integrität der CFS-Regionen beschrieben (Casper *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2002; Arlt *et al.*, 2004).

Basierend auf diesem Wissen und den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen postulieren wir, daß speziell die Stagnierung der DNA-Replikationsgabel an großen, transkriptionell aktiven Stellen - eventuell begründet durch deren offenere Chromatinstruktur - und das anschließende Unterlaufen von DNA-Replikations-Checkpoints in der Ausbildung von CFSs und damit in einem Anstieg von Doppelstrangbrüchen resultiert.

6 Zusammenfassung

Ein kompliziertes Netzwerk aus Signaltransduktionswegen bewahrt unsere Zellen vor unkontrolliertem Wachstum. Der Ausfall von Teilen dieses Netzwerkes begünstigt die Initiierung und Progression von Tumoren. Damit die Therapie von Neoplasien Erfolg haben kann, muß sie auf den individuellen Tumor und dessen genetische und epigenetische Defekte abgestimmt sein. Daher ist ein besseres Verständnis der Wirkungsweisen von Zellzyklus-regulierenden Proteinen und deren Vernetzungen in Signaltransduktionsketten unbedingt erforderlich.

Unsere Studie richtete sich auf die Tumorsuppressoren *INK4a* und *ARF*, welche in einer Vielzahl humaner Tumore verloren sind. Durch die molekular-zytogenetische Charakterisierung von *ARF*null- und *INK4a/ARF*null-Lymphomen in einem c-myc-aktivierten Mausmodell wurden spezifische chromosomale Aberrationen gefunden, welche neue Kenntnisse über die Wirkungsweisen der beiden Tumorsuppressoren im neoplastischen Prozeß erlauben. *INK4a/ARF*null-Lymphome entstanden gegenüber den *ARF*null-Lymphomen schneller und mit einer geringeren Anzahl karyotypischer Anomalien. Demnach benötigen *ARF*null-Lymphome in Anwesenheit von intaktem *INK4a* offenbar zusätzliche Defekte (häufig eine dritte Kopie des Chromosoms 14), um ein onkogenes Potential, vergleichbar mit dem von *INK4a/ARF*null-Lymphomen, zu entwickeln.

Weiterhin verglichen wir die zytogenetischen Ergebnisse mit dem Therapieverlauf der Tumore nach Cyclophosphamid-Behandlung. In *ARF*null-Lymphomen erkannten wir in dem Gewinn des Chromosoms 14 einen Marker für gute und in dem Zugewinn des Chromosoms 6 einen Marker für schlechte Behandlungserfolge. Auf den Chromosomen 6 und 14 der Maus liegen demnach bisher unbekannte Gene, welche für die Wahl der Behandlungsmethode *ARF*-defizienter Tumore von entscheidender Bedeutung sind.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit CFSs, die als „hot spots“ für chromosomale Brüche und Umbauten in Tumorgenese und Karyotypevolution diskutiert werden. CFSs werden *in vitro* durch Zugabe von Replikations-hemmenden Chemikalien, wie APC, als Lücken im Chromatin oder als partiell deletierte bzw. rearrangierte Chromosomen sichtbar gemacht. Die Häufigkeit ihres Auftretens in distinkten zytogenetischen Banden variiert zwischen unterschiedlichen Gewebetypen.

Wir untersuchten die CFS-Expression in Lymphozytenkulturen der Mausstämme BALB/c und C57BL/6. Bereits ohne Induktion durch APC traten Chromatidlücken und Doppelstrangbrüche / Translokationen mit geringer Häufigkeit auf. Diese spontanen Läsionen kartierten in chromosomale Banden, deren CFS-Ausbildung unter dem Einfluß von APC durchschnittlich oder überdurchschnittlich war, nicht jedoch in stabile Banden. Damit bekräftigten wir die Vorstellung, nach der CFSs auch unter physiologischen Bedingungen Bereiche erhöhter Brüchigkeit darstellen.

Die Gesamtanzahl der APC-induzierten CFSs lag in den Zellen der BALB/c-Mäuse über der in C57BL/6-Zellen, vermutlich als Folge eines BALB/c-spezifischen Polymorphismus in der kodierenden Region eines DNA-Reparatur-Proteins. Die relativen CFS-Häufigkeiten der einzelnen Banden wiesen jedoch im Vergleich der Daten beider Stämme eine signifikante Korrelation und damit eine starke Konservierung auf. Zudem wurde zwischen Maus / Mensch-syntenischen Bereichen ebenfalls eine Konservierung der

relativen CFS-Häufigkeiten detektiert. Die Tendenz zur CFS-Bildung ist also ein spezifisches Merkmal jedes chromosomalen Abschnitts, das evolutionär konserviert ist.

Weiterhin kartierten wir einzelne CFSs mit molekular-zytogenetischen Methoden. Auf diese Weise beschrieben wir erstmals eines der zehn häufigsten CFSs menschlicher Lymphozyten, FRA7K, und erweiterten somit die Anzahl molekular charakterisierter humaner CFSs auf insgesamt 13. Für fünf dieser CFSs analysierten wir mittels FISH-Analyse die homologen Bereiche im Mausgenom hinsichtlich ihrer CFS-Expression. Die beobachteten Läsionen traten jeweils in exakt den entsprechenden Sequenzen auf. Vereint man diese fünf Beispiele (FRA2G/Fra2D, FRA7G/Fra6A3.1, FRA7H/Fra6B1, FRA7K/Fra12C1 und FRA9E/Fra4C2) mit bekannten Homologen aus der Literatur, so wurde für insgesamt acht CFSs eine Konservierung zwischen Mensch und Maus auf molekularer Ebene gefunden. Darüberhinaus stellten wir eine signifikante Korrelation der Häufigkeiten der homologen CFSs fest. Evolutionäre Synteniebrüche waren in den Sequenzen der Mensch- und Maus-CFSs weniger häufig als in stabilen Vergleichsregionen. Die Instabilität der CFSs hat demnach wahrscheinlich nicht zur Karyotypevolution beigetragen.

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist der zelluläre Mechanismus, der die Ausbildung von CFSs an spezifischen Stellen des Genoms bewirkt, bis heute weitgehend unklar. Bekannt ist, daß CFSs durch Replikationsinhibition induziert werden und in Metaphase-Zellen sichtbar werden, welche DNA-Replikations-Checkpoints unterlaufen haben. Sämtliche jüngeren Studien beschrieben Inseln erhöhter DNA-Helix-Flexibilität (Schwankungen im Biegungswinkel des Moleküls) in den Bereichen von CFSs. Wir berechneten die DNA-Helix-Flexibilität entlang der Sequenz für alle molekular kartierten humanen und Maus-CFSs sowie für stabile Kontrollregionen. Anders als in der Literatur beschrieben, fanden wir für Mensch und Maus, daß sich CFSs und Kontroll-DNA-Abschnitte in ihrer Dichte an Inseln mit erhöhter DNA-Helix-Flexibilität nicht unterscheiden.

Nahezu alle Regionen der häufigen molekular charakterisierten CFSs umfassen große Gene, deren Exons mehr als 650 kb genomische Sequenz überspannen. Im Gegensatz dazu traten große Gene in den stabilen Kontrollregionen deutlich seltener auf. Öffentlich zugängliche RNA-Expressionsdaten dieser Gene zeigten, daß CFSs bevorzugt in Bereichen mit transkriptionell aktiven, großen Genen entstehen. Darauf und auf dem Wissen aus der Literatur begründen wir die Hypothese, daß eine Blockierung der DNA-Replikationsgabel, vor allem in Bereichen großer transkriptionell aktiver Gene - eventuell begründet durch deren offenere Chromatinstruktur - und das anschließende Unterlaufen von Zellzyklus-Checkpoints an der Bildung von CFSs und damit in einem Anstieg von Doppelstrangbrüchen beteiligt sind.

7 Abkürzungen

ANCA	durchschnittliche Anzahl chromosomaler Aberrationen (average number of chromosome aberrations)
APC	Aphidicolin
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
BFB	Breakage-fusion-bridge
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CFS	Common Fragile Site
CGH	Komparative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization)
CL	Chromatinlücke
CTX	Cyclophosphamid
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DSB	Doppelstrangbruch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOP-PCR	Degenerate-Oligonucleotide-Primed-Polymerase-Chain-Reaction
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FRA3B	menschliches Fragile Site in Chromosom 3
Fra12C1	Maus-Fragile Site in der Chromosomenbande 12C1
g	Gramm
LB	Luria-Bertani Broth-Medium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
NHEJ	non-homologous end joining
h	Stunde
kb	Kilobasen
l	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
M	Molar
Mb	Megabasen
mM	Millimolar
min	Minute
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RFS	Rare Fragile Site
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SB	Synteniebruch
SKY	Spektrale Karyotypisierung
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
UV	Ultraviolett
U	Unit (Maß für die Aktivität eines Enzyms)
Vol	Volumen

8 Literatur

- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1985). *Nature*, **318**, 533-8.
- Arlt, M.F., Miller, D.E., Beer, D.G. & Glover, T.W. (2002). *Genes Chromosomes Cancer*, **33**, 82-92.
- Arlt, M.F., Xu, B., Durkin, S.G., Casper, A.M., Kastan, M.B. & Glover, T.W. (2004). *Mol Cell Biol*, **24**, 6701-9.
- Austin, M.J., Collins, J.M., Corey, L.A., Nance, W.E., Neale, M.C., Schieken, R.M. & Brown, J.A. (1992). *Am J Hum Genet*, **50**, 76-83.
- Bailey, J.A., Yavor, A.M., Massa, H.F., Trask, B.J. & Eichler, E.E. (2001). *Genome Res*, **11**, 1005-17.
- Becker, N.A., Thorland, E.C., Denison, S.R., Phillips, L.A. & Smith, D.I. (2002). *Oncogene*, **21**, 8713-22.
- Bertin, R., Acquaviva, C., Mirebeau, D., Guidal-Giroux, C., Vilmer, E. & Cave, H. (2003). *Genes Chromosomes Cancer*, **37**, 44-57.
- Bohm, U., Dahm, P.F., McAllister, B.F. & Greenbaum, I.F. (1995). *Hum Genet*, **95**, 249-56.
- Boldog, F., Gemmill, R.M., West, J., Robinson, M., Robinson, L., Li, E., Roche, J., Todd, S., Waggoner, B., Lundstrom, R., Jacobson, J., Mullokandov, M.R., Klinger, H. & Drabkin, H.A. (1997). *Hum Mol Genet*, **6**, 193-203.
- Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P.A., Lomax, M., James, M.C., Vatcheva, R., Bates, S., Vousden, K.H., Parry, D., Gruis, N., Smit, N., Bergman, W. & Peters, G. (2002). *Embo J*, **21**, 2936-45.
- Byrnes, J.J. (1984). *Mol Cell Biochem*, **62**, 13-24.
- Callahan, G., Denison, S.R., Phillips, L.A., Shridhar, V. & Smith, D.I. (2003). *Oncogene*, **22**, 590-601.
- Carme, F., Rosa, M. & Josep, E. (1999). *Mutat Res*, **430**, 47-53.
- Carter, T.L., Reaman, G.H. & Kees, U.R. (2001a). *Br J Haematol*, **113**, 323-8.
- Carter, T.L., Watt, P.M., Kumar, R., Burton, P.R., Reaman, G.H., Sather, H.N., Baker, D.L. & Kees, U.R. (2001b). *Blood*, **97**, 572-4.
- Casper, A.M., Nghiem, P., Arlt, M.F. & Glover, T.W. (2002). *Cell*, **111**, 779-89.
- Cheng, C.H. & Kuchta, R.D. (1993). *Biochemistry*, **32**, 8568-74.
- Ciullo, M., Debily, M.A., Rozier, L., Autiero, M., Billault, A., Mayau, V., El Marhomy, S., Guardiola, J., Bernheim, A., Coullin, P., Piatier-Tonneau, D. & Debatisse, M. (2002). *Hum Mol Genet*, **11**, 2887-94.
- Coleman, A.E., Ried, T. & Janz, S. (2000). *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 70-4.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*, Second Edition, The Development and Causes of Cancer.
- Coquelle, A., Pipiras, E., Toledo, F., Buttin, G. & Debatisse, M. (1997). *Cell*, **89**, 215-25.
- Cortellino, S., Turner, D., Masciullo, V., Schepis, F., Albino, D., Daniel, R., Skalka, A.M., Meropol, N.J., Alberti, C., Larue, L. & Bellacosa, A. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15071-6. Epub 2003 Nov 12.
- Davisson, M.T. (1997). *Transgenic Res*, **6**, 309-19.
- De Braekeleer, M., Smith, B. & Lin, C.C. (1985). *Hum Genet*, **69**, 112-6.

- Debily, M.A., Camarca, A., Ciullo, M., Mayer, C., El Marhomy, S., Ba, I., Jalil, A., Anzisi, A., Guardiola, J. & Piatier-Tonneau, D. (2004). *Hum Mol Genet*, **13**, 323-34. Epub 2003 Dec 8.
- Denison, S.R., Callahan, G., Becker, N.A., Phillips, L.A. & Smith, D.I. (2003a). *Genes Chromosomes Cancer*, **38**, 40-52.
- Denison, S.R., Simper, R.K. & Greenbaum, I.F. (2003b). *Cytogenet Genome Res*, **101**, 8-16.
- Denison, S.R., Wang, F., Becker, N.A., Schule, B., Kock, N., Phillips, L.A., Klein, C. & Smith, D.I. (2003c). *Oncogene*, **22**, 8370-8.
- Djalali, M., Adolph, S., Steinbach, P., Winking, H. & Hameister, H. (1987). *Hum Genet*, **77**, 157-62.
- du Manoir, S., Schrock, E., Bentz, M., Speicher, M.R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P. & Cremer, T. (1995). *Cytometry*, **19**, 27-41.
- du Manoir, S., Speicher, M.R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P. & Cremer, T. (1993). *Hum Genet*, **90**, 590-610.
- Eichler, E.E., Archidiacono, N. & Rocchi, M. (1999). *Genome Res*, **9**, 1048-58.
- el Rouby, S., Thomas, A., Costin, D., Rosenberg, C.R., Potmesil, M., Silber, R. & Newcomb, E.W. (1993). *Blood*, **82**, 3452-9.
- Elder, F.F. & Robinson, T.J. (1989). *Chromosoma*, **97**, 459-64.
- Faderl, S., Kantarjian, H.M., Estey, E., Manshouri, T., Chan, C.Y., Rahman Elsaied, A., Kornblau, S.M., Cortes, J., Thomas, D.A., Pierce, S., Keating, M.J., Estrov, Z. & Albitar, M. (2000). *Cancer*, **89**, 1976-82.
- Ferber, M.J., Thorland, E.C., Brink, A.A., Rapp, A.K., Phillips, L.A., McGovern, R., Gostout, B.S., Cheung, T.H., Chung, T.K., Fu, W.Y. & Smith, D.I. (2003). *Oncogene*, **22**, 7233-42.
- Ferguson-Smith, M.A. (1997). *Eur J Hum Genet*, **5**, 253-65.
- Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A.M., Perricaudet, M., Ashworth, A. & Jeggo, P. (2003). *Embo J*, **22**, 2860-71.
- Garini, Y., Gil, A., Bar-Am, I., Cabib, D. & Katzir, N. (1999). *Cytometry*, **35**, 214-26.
- Glover, T.W., Hoge, A.W., Miller, D.E., Ascara-Wilke, J.E., Adam, A.N., Dagenais, S.L., Wilke, C.M., Dierick, H.A. & Beer, D.G. (1998). *Cancer Res*, **58**, 3409-14.
- Glover, T.W. & Stein, C.K. (1987). *Am J Hum Genet*, **41**, 882-90.
- Gregory, S.G., Sekhon, M., Schein, J., Zhao, S., Osoegawa, K., Scott, C.E., Evans, R.S., Burrige, P.W., Cox, T.V., Fox, C.A., Hutton, R.D., Mullenger, I.R., Phillips, K.J., Smith, J., Stalker, J., Threadgold, G.J., Birney, E., Wylie, K., Chinwalla, A., Wallis, J., Hillier, L., Carter, J., Gaige, T., Jaeger, S., Kremitzki, C., Layman, D., Maas, J., McGrane, R., Mead, K., Walker, R., Jones, S., Smith, M., Asano, J., Bosdet, I., Chan, S., Chittaranjan, S., Chiu, R., Fjell, C., Fuhrmann, D., Girn, N., Gray, C., Guin, R., Hsiao, L., Krzywinski, M., Kutsche, R., Lee, S.S., Mathewson, C., McLeavy, C., Messervier, S., Ness, S., Pandoh, P., Prabhu, A.L., Saeedi, P., Smailus, D., Spence, L., Stott, J., Taylor, S., Terpstra, W., Tsai, M., Vardy, J., Wye, N., Yang, G., Shatsman, S., Ayodeji, B., Geer, K., Tsegaye, G., Shvartsbeyn, A., Gebregeorgis, E., Krol, M., Russell, D., Overton, L., Malek, J.A., Holmes, M., Heaney, M., Shetty, J., Feldblyum, T., Niernan, W.C., Catanese, J.J., Hubbard, T., Waterston, R.H., Rogers, J., de Jong, P.J., Fraser, C.M., Marra, M., McPherson, J.D. & Bentley, D.R. (2002). *Nature*, **418**, 743-50.
- Gruttgen, A., Reichenzeller, M., Junger, M., Schlien, S., Affolter, A. & Bosch, F.X. (2001). *J Pathol*, **194**, 311-7.

- Guan, X.Y., Meltzer, P.S. & Trent, J.M. (1994). *Genomics*, **22**, 101-7.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2000). *Cell*, **100**, 57-70.
- Handt, O., Sutherland, G.R. & Richards, R.I. (2000). *Mol Genet Metab*, **70**, 99-105.
- Hellman, A., Rahat, A., Scherer, S.W., Darvasi, A., Tsui, L.C. & Kerem, B. (2000). *Mol Cell Biol*, **20**, 4420-7.
- Hellman, A., Zlotorynski, E., Scherer, S.W., Cheung, J., Vincent, J.B., Smith, D.I., Trakhtenbrot, L. & Kerem, B. (2002). *Cancer Cell*, **1**, 89-97.
- Hirsch, B. (1991). *Hum Genet*, **87**, 302-6.
- Hu, B., Han, S.Y., Wang, X., Ottey, M., Potoczek, M.B., Dicker, A., Huebner, K. & Wang, Y. (2004). *J Cell Physiol*, **9**, 9.
- Huang, H., Qian, C., Jenkins, R.B. & Smith, D.I. (1998a). *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 152-9.
- Huang, H., Qian, J., Proffitt, J., Wilber, K., Jenkins, R. & Smith, D.I. (1998b). *Oncogene*, **16**, 2311-9.
- Huang, H., Reed, C.P., Mordi, A., Lomberg, G., Wang, L., Shridhar, V., Hartmann, L., Jenkins, R. & Smith, D.I. (1999). *Genes Chromosomes Cancer*, **24**, 48-55.
- Huang, L.W., Chao, S.L. & Chen, T.J. (2003). *Gynecol Oncol*, **90**, 331-7.
- Huebner, K. & Croce, C.M. (2001). *Nat Rev Cancer*, **1**, 214-21.
- Huebner, K., Druck, T., Siprashvili, Z., Croce, C.M., Kovatich, A. & McCue, P.A. (1998). *Recent Results Cancer Res*, **154**, 200-15.
- Ichikawa, A., Kinoshita, T., Watanabe, T., Kato, H., Nagai, H., Tsushita, K., Saito, H. & Hotta, T. (1997). *N Engl J Med*, **337**, 529-34.
- Ishii, H., Vecchione, A., Furukawa, Y., Suteesophon, K., Han, S.Y., Druck, T., Kuroki, T., Trapasso, F., Nishimura, M., Saito, Y., Ozawa, K., Croce, C.M. & Huebner, K. (2003). *Mol Cancer Res*, **1**, 940-7.
- Jacobs, J.J., Scheijen, B., Voncken, J.W., Kieboom, K., Berns, A. & van Lohuizen, M. (1999). *Genes Dev*, **13**, 2678-90.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F. & Pinkel, D. (1992). *Science*, **258**, 818-21.
- Kamijo, T., Bodner, S., van de Kamp, E., Randle, D.H. & Sherr, C.J. (1999). *Cancer Res*, **59**, 2217-22.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G. & Sherr, C.J. (1997). *Cell*, **91**, 649-59.
- Kang, M.K., Bibb, C., Baluda, M.A., Rey, O. & Park, N.H. (2000). *Exp Cell Res*, **258**, 288-97.
- Klangby, U., Okan, I., Magnusson, K.P., Wendland, M., Lind, P. & Wiman, K.G. (1998). *Blood*, **91**, 1680-7.
- Kok, K., Naylor, S.L. & Buys, C.H. (1997). *Adv Cancer Res*, **71**, 27-92.
- Kost-Alimova, M., Kiss, H., Fedorova, L., Yang, Y., Dumanski, J.P., Klein, G. & Imreh, S. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6622-7.
- Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A. & Berns, A. (2001). *Nature*, **413**, 83-6.
- Krummel, K.A., Denison, S.R., Calhoun, E., Phillips, L.A. & Smith, D.I. (2002). *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 154-67.
- Krummel, K.A., Roberts, L.R., Kawakami, M., Glover, T.W. & Smith, D.I. (2000). *Genomics*, **69**, 37-46.
- Kuo, M.T., Vyas, R.C., Jiang, L.X. & Hittelman, W.N. (1994). *Mol Cell Biol*, **14**, 5202-11.

- Labuhn, M., Jones, G., Speel, E.J., Maier, D., Zweifel, C., Gratzl, O., Van Meir, E.G., Hegi, M.E. & Merlo, A. (2001). *Oncogene*, **20**, 1103-9.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J.P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J.C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Hillier, L.W., McPherson, J.D., Marra, M.A., Mardis, E.R., Fulton, L.A., Chinwalla, A.T., Pepin, K.H., Gish, W.R., Chissoe, S.L., Wendl, M.C., Delehaunty, K.D., Miner, T.L., Delehaunty, A., Kramer, J.B., Cook, L.L., Fulton, R.S., Johnson, D.L., Minx, P.J., Clifton, S.W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J.F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., et al. (2001). *Nature*, **409**, 860-921.
- Langer, P.R., Waldrop, A.A. & Ward, D.C. (1981). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6633-7.
- Le Beau, M.M., Rassool, F.V., Neilly, M.E., Espinosa, R., 3rd, Glover, T.W., Smith, D.I. & McKeithan, T.W. (1998). *Hum Mol Genet*, **7**, 755-61.
- Limongi, M.Z., Pelliccia, F. & Rocchi, A. (2003). *Genomics*, **81**, 93-7.
- Liyanage, M., Coleman, A., du Manoir, S., Veldman, T., McCormack, S., Dickson, R.B., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A., Janz, S., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Schrock, E. & Ried, T. (1996). *Nat Genet*, **14**, 312-5.
- Loeb, A.M., Arlt, M.F., Morrish, T.A., Glover, T.W. (2001). *Am J hum Genet*, **69**, 329S.
- Maloney, K.W., McGavran, L., Odom, L.F. & Hunger, S.P. (1999). *Blood*, **93**, 2380-5.
- Mangelsdorf, M., Ried, K., Woollatt, E., Dayan, S., Eyre, H., Finnis, M., Hobson, L., Nancarrow, J., Venter, D., Baker, E. & Richards, R.I. (2000). *Cancer Res*, **60**, 1683-9.
- Mariani, T. (1989). *Hum Genet*, **81**, 319-22.
- Matsuyama, A., Shiraishi, T., Trapasso, F., Kuroki, T., Alder, H., Mori, M., Huebner, K. & Croce, C.M. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 14988-93. Epub 2003 Nov 20.
- Matthäi *et al.*, Manuskript in Vorbereitung
- McAllister, B.F. & Greenbaum, I.F. (1997). *Hum Genet*, **100**, 182-8.
- Michael, D. & Rajewsky, M.F. (2001). *Oncogene*, **20**, 1798-801.
- Mimori, K., Druck, T., Inoue, H., Alder, H., Berk, L., Mori, M., Huebner, K. & Croce, C.M. (1999). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7456-61.
- Mishmar, D., Rahat, A., Scherer, S.W., Nyakatura, G., Hinzmann, B., Kohwi, Y., Mandel-Gutfroind, Y., Lee, J.R., Drescher, B., Sas, D.E., Margalit, H., Platzter, M., Weiss, A., Tsui, L.C., Rosenthal, A. & Kerem, B. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8141-6.
- Moorman, A.V., Richards, S.M., Martineau, M., Cheung, K.L., Robinson, H.M., Jalali, G.R., Broadfield, Z.J., Harris, R.L., Taylor, K.E., Gibson, B.E., Hann, I.M., Hill, F.G., Kinsey, S.E., Eden, T.O., Mitchell, C.D. & Harrison, C.J. (2003). *Blood*, **102**, 2756-62. Epub 2003 Jun 26.

- Morelli, C., Karayianni, E., Magnanini, C., Mungall, A.J., Thorland, E., Negrini, M., Smith, D.I. & Barbanti-Brodano, G. (2002). *Oncogene*, **21**, 7266-76.
- Morgan, R., Morgan, S.S., Hecht, B.K. & Hecht, F. (1988). *Cancer Genet Cytogenet*, **31**, 47-53.
- Murano, I., Kuwano, A. & Kajii, T. (1989a). *Hum Genet*, **84**, 71-4.
- Murano, I., Kuwano, A. & Kajii, T. (1989b). *Hum Genet*, **83**, 45-8.
- Nakamura, M., Sakaki, T., Hashimoto, H., Nakase, H., Ishida, E., Shimada, K. & Konishi, N. (2001). *Cancer Res*, **61**, 6335-9.
- Newcomb, E.W. (1995). *Leuk Lymphoma*, **17**, 211-21.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W. & Weinert, T.A. (2002). *Annu Rev Genet*, **36**, 617-56. Epub 2002 Jun 11.
- Paige, A.J., Taylor, K.J., Stewart, A., Sgouros, J.G., Gabra, H., Sellar, G.C., Smyth, J.F., Porteous, D.J. & Watson, J.E. (2000). *Cancer Res*, **60**, 1690-7.
- Palakodeti, A., Han, Y., Jiang, Y. & Le Beau, M.M. (2004). *Genes Chromosomes Cancer*, **39**, 71-6.
- Pardue, M.L. & Gall, J.G. (1969). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **64**, 600-4.
- Park, M.J., Shimizu, K., Nakano, T., Park, Y.B., Kohno, T., Tani, M. & Yokota, J. (2003). *Cancer Genet Cytogenet*, **141**, 5-13.
- Pedrali-Noy, G., Kuenzle, C.C., Focher, F., Belvedere, M. & Spadari, S. (1981). *J Biochem Biophys Methods*, **4**, 113-21.
- Petek, E., Windpassinger, C., Vincent, J.B., Cheung, J., Boright, A.P., Scherer, S.W., Kroisel, P.M. & Wagner, K. (2001). *Am J Hum Genet*, **68**, 848-58.
- Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J. & Gray, J. (1988). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9138-42.
- Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., Collins, C., Kuo, W.L., Chen, C., Zhai, Y., Dairkee, S.H., Ljung, B.M., Gray, J.W. & Albertson, D.G. (1998). *Nat Genet*, **20**, 207-11.
- Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Waldman, F.M., Gray, J.W. & Pinkel, D. (1995). *Cytometry*, **19**, 10-26.
- Ponnaiya, B., Cornforth, M.N. & Ullrich, R.L. (1997). *Radiat Res*, **147**, 121-5.
- Popescu, N.C. (2003). *Cancer Lett*, **192**, 1-17.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. (1995). *Cell*, **83**, 993-1000.
- Ragin, C.C., Reshmi, S.C. & Gollin, S.M. (2004). *Int J Cancer*, **110**, 701-9.
- Randerson-Moor, J.A., Harland, M., Williams, S., Cuthbert-Heavens, D., Sheridan, E., Aveyard, J., Sibley, K., Whitaker, L., Knowles, M., Bishop, J.N. & Bishop, D.T. (2001). *Hum Mol Genet*, **10**, 55-62.
- Rassool, F.V., McKeithan, T.W., Neilly, M.E., van Melle, E., Espinosa, R., 3rd & Le Beau, M.M. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6657-61.
- Richards, R.I. (2001). *Trends Genet*, **17**, 339-45.
- Ried, K., Finnis, M., Hobson, L., Mangelsdorf, M., Dayan, S., Nancarrow, J.K., Woollatt, E., Kremmidiotis, G., Gardner, A., Venter, D., Baker, E. & Richards, R.I. (2000). *Hum Mol Genet*, **9**, 1651-63.
- Riggs, P.K., Kuczek, T., Chrisman, C.L. & Bidwell, C.A. (1993). *Cytogenet Cell Genet*, **62**, 110-6.
- Robles, S.J. & Adami, G.R. (1998). *Oncogene*, **16**, 1113-23.
- Rodriguez, V., Llambi, S., Postiglioni, A., Guevara, K., Rincon, G., Fernandez, G., Mernies, B. & Arruga, M.V. (2002). *Genet Sel Evol*, **34**, 649-56.
- Ronne, M. (1992). *Hereditas*, **117**, 127-36.

- Ronne, M. (1995). *Hereditas*, **122**, 279-83.
- Rosenwald, A., Wright, G., Wiestner, A., Chan, W.C., Connors, J.M., Campo, E., Gascoyne, R.D., Grogan, T.M., Muller-Hermelink, H.K., Smeland, E.B., Chiorazzi, M., Giltman, J.M., Hurt, E.M., Zhao, H., Averett, L., Henrickson, S., Yang, L., Powell, J., Wilson, W.H., Jaffe, E.S., Simon, R., Klausner, R.D., Montserrat, E., Bosch, F., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Sanger, W.G., Dave, B.J., Lynch, J.C., Vose, J., Armitage, J.O., Fisher, R.I., Miller, T.P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Holte, H., Delabie, J. & Staudt, L.M. (2003). *Cancer Cell*, **3**, 185-97.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. & Lobrich, M. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 5706-15.
- Rozier, L., El-Achkar, E., Apiou, F. & Debatisse, M. (2004). *Oncogene*, **2**, 2.
- Ruas, M. & Peters, G. (1998). *Biochim Biophys Acta*, **1378**, F115-77.
- Ruiz-Herrera, A., Ponsa, M., Garcia, F., Egozcue, J. & Garcia, M. (2002). *Chromosome Res*, **10**, 33-44.
- Sanz, M.M., Jenkins, E.C., Brown, W.T., Davisson, M.T., Kevin, M.J., Roderick, T.H., Silverman, W.P. & Wisniewski, H.M. (1986). *Am J Med Genet*, **23**, 491-509.
- Sarai, A., Mazur, J., Nussinov, R. & Jernigan, R.L. (1989). *Biochemistry*, **28**, 7842-9.
- Scherer, S.W., Cheung, J., MacDonald, J.R., Osborne, L.R., Nakabayashi, K., Herbrick, J.A., Carson, A.R., Parker-Katiraei, L., Skaug, J., Khaja, R., Zhang, J., Hudek, A.K., Li, M., Haddad, M., Duggan, G.E., Fernandez, B.A., Kanematsu, E., Gentles, S., Christopoulos, C.C., Choufani, S., Kwasnicka, D., Zheng, X.H., Lai, Z., Nusskern, D., Zhang, Q., Gu, Z., Lu, F., Zeesman, S., Nowaczyk, M.J., Teshima, I., Chitayat, D., Shuman, C., Weksberg, R., Zackai, E.H., Grebe, T.A., Cox, S.R., Kirkpatrick, S.J., Rahman, N., Friedman, J.M., Heng, H.H., Pelicci, P.G., Lo-Coco, F., Belloni, E., Shaffer, L.G., Pober, B., Morton, C.C., Gusella, J.F., Bruns, G.A., Korf, B.R., Quade, B.J., Ligon, A.H., Ferguson, H., Higgins, A.W., Leach, N.T., Herrick, S.R., Lemyre, E., Farra, C.G., Kim, H.G., Summers, A.M., Gripp, K.W., Roberts, W., Szatmari, P., Winsor, E.J., Grzeschik, K.H., Teebi, A., Minassian, B.A., Kere, J., Armengol, L., Pujana, M.A., Estivill, X., Wilson, M.D., Koop, B.F., Tosi, S., Moore, G.E., Bricht, A.P., Zlotorynski, E., Kerem, B., Kroisel, P.M., Petek, E., Oscier, D.G., Mould, S.J., Dohner, H., Dohner, K., Rommens, J.M., Vincent, J.B., Venter, J.C., Li, P.W., Mural, R.J., Adams, M.D. & Tsui, L.C. (2003). *Science*, **300**, 767-72.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M. & Lowe, S.W. (2002). *Cell*, **109**, 335-46.
- Schmitt, C.A., McCurrach, M.E., de Stanchina, E., Wallace-Brodeur, R.R. & Lowe, S.W. (1999). *Genes Dev*, **13**, 2670-7.
- Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., Schoell, B., Wienberg, J., Ferguson-Smith, M.A., Ning, Y., Ledbetter, D.H., Bar-Am, I., Soenksen, D., Garini, Y. & Ried, T. (1996). *Science*, **273**, 494-7.
- Schrock, E., Veldman, T., Padilla-Nash, H., Ning, Y., Spurbeck, J., Jalal, S., Shaffer, L.G., Papenhausen, P., Kozma, C., Phelan, M.C., Kjeldsen, E., Schonberg, S.A., O'Brien, P., Biesecker, L., du Manoir, S. & Ried, T. (1997). *Hum Genet*, **101**, 255-62.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D. & DePinho, R.A. (1996). *Cell*, **85**, 27-37.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. (1997). *Cell*, **88**, 593-602.

- Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W. & DePinho, R.A. (2001). *Nature*, **413**, 86-91.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (1999). *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 22-30.
- Sharpless, N.E. & DePinho, R.A. (2004). *J Clin Invest*, **113**, 160-8.
- Sheaff, R., Ilsley, D. & Kuchta, R. (1991). *Biochemistry*, **30**, 8590-7.
- Sherr, C.J. (2001a). *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 731-7.
- Sherr, C.J. (2001b). *Cell*, **106**, 531-4.
- Shiraishi, T., Druck, T., Mimori, K., Flomenberg, J., Berk, L., Alder, H., Miller, W., Huebner, K. & Croce, C.M. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5722-7.
- Simoncic, I. & Gericke, G.S. (1996). *Hum Genet*, **97**, 524-31.
- Simpkins, S.B., Bocker, T., Swisher, E.M., Mutch, D.G., Gersell, D.J., Kovatich, A.J., Palazzo, J.P., Fishel, R. & Goodfellow, P.J. (1999). *Hum Mol Genet*, **8**, 661-6.
- Sinden, R.R. (2001). *Nature*, **411**, 757-8.
- Smeets, D.F. & van de Klundert, F.A. (1990). *Cytogenet Cell Genet*, **53**, 8-14.
- Snijders, A.M., Fridlyand, J., Mans, D.A., Segraves, R., Jain, A.N., Pinkel, D. & Albertson, D.G. (2003). *Oncogene*, **22**, 4370-9.
- Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S. & Ward, D.C. (1996). *Nat Genet*, **12**, 368-75.
- Stein, C.K., Glover, T.W., Palmer, J.L. & Glisson, B.S. (2002). *Genes Chromosomes Cancer*, **34**, 333-40.
- Stone, D.M., Jacky, P.B., Hancock, D.D. & Prieur, D.J. (1991). *Am J Med Genet*, **40**, 214-22.
- Storer, J.B., Mitchell, T.J. & Fry, R.J. (1988). *Radiat Res*, **114**, 331-53.
- Stout-Weider *et al.*, Manuskript in Vorbereitung
- Strachan, T. & Read, A.P. (1999) *Human Molecular Genetics 2*, Second edition, 14.3 Evolution of the human sex chromosomes.
- Su, A.I., Cooke, M.P., Ching, K.A., Hakak, Y., Walker, J.R., Wiltshire, T., Orth, A.P., Vega, R.G., Sapinoso, L.M., Moqrich, A., Patapoutian, A., Hampton, G.M., Schultz, P.G. & Hogenesch, J.B. (2002). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 4465-70. Epub 2002 Mar 19.
- Suzuki, K., Mori, I., Nakayama, Y., Miyakoda, M., Kodama, S. & Watanabe, M. (2001). *Radiat Res*, **155**, 248-253.
- Takebayashi, S., Nakao, M., Fujita, N., Sado, T., Tanaka, M., Taguchi, H. & Okumura, K. (2001). *Biochem Biophys Res Commun*, **288**, 921-6.
- Tedeschi, B., Vernole, P., Sanna, M.L. & Nicoletti, B. (1992). *Hum Genet*, **89**, 543-7.
- Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjold, M., Ponder, B.A. & Tunnacliffe, A. (1992). *Genomics*, **13**, 718-25.
- Thorland, E.C., Myers, S.L., Gostout, B.S. & Smith, D.I. (2003). *Oncogene*, **22**, 1225-37.
- Tonnies, H. (2002). *Trends Mol Med*, **8**, 246-50.
- Turner, B.C., Ottey, M., Zimonjic, D.B., Potoczek, M., Hauck, W.W., Pequignot, E., Keck-Waggoner, C.L., Seignani, C., Aldaz, C.M., McCue, P.A., Palazzo, J., Huebner, K. & Popescu, N.C. (2002). *Cancer Res*, **62**, 4054-60.
- Ureta-Vidal, A., Ettwiller, L. & Birney, E. (2003). *Nat Rev Genet*, **4**, 251-62.
- Viswanathan, M., Tsuchida, N. & Shanmugam, G. (2001). *Oral Oncol*, **37**, 341-4.
- Vooijs, M., Yu, L.C., Tkachuk, D., Pinkel, D., Johnson, D. & Gray, J.W. (1993). *Am J Hum Genet*, **52**, 586-97.
- Wang, L., Darling, J., Zhang, J.S., Huang, H., Liu, W. & Smith, D.I. (1999). *Hum Mol Genet*, **8**, 431-7.

- Wang, L., Darling, J., Zhang, J.S., Qian, C.P., Hartmann, L., Conover, C., Jenkins, R. & Smith, D.I. (1998). *Oncogene*, **16**, 635-42.
- Wang, Y. & Qin, J. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15387-92. Epub 2003 Dec 03.
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S.E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., Bloom, T., Bork, P., Botcherby, M., Bray, N., Brent, M.R., Brown, D.G., Brown, S.D., Bult, C., Burton, J., Butler, J., Campbell, R.D., Carninci, P., Cawley, S., Chiaromonte, F., Chinwalla, A.T., Church, D.M., Clamp, M., Clee, C., Collins, F.S., Cook, L.L., Copley, R.R., Coulson, A., Couronne, O., Cuff, J., Curwen, V., Cutts, T., Daly, M., David, R., Davies, J., Delehaunty, K.D., Deri, J., Dermitzakis, E.T., Dewey, C., Dickens, N.J., Diekhans, M., Dodge, S., Dubchak, I., Dunn, D.M., Eddy, S.R., Elnitski, L., Emes, R.D., Eswara, P., Eyraes, E., Felsenfeld, A., Fewell, G.A., Flicek, P., Foley, K., Frankel, W.N., Fulton, L.A., Fulton, R.S., Furey, T.S., Gage, D., Gibbs, R.A., Glusman, G., Gnerre, S., Goldman, N., Goodstadt, L., Grafham, D., Graves, T.A., Green, E.D., Gregory, S., Guigo, R., Guyer, M., Hardison, R.C., Haussler, D., Hayashizaki, Y., Hillier, L.W., Hinrichs, A., Hlavina, W., Holzer, T., Hsu, F., Hua, A., Hubbard, T., Hunt, A., Jackson, I., Jaffe, D.B., Johnson, L.S., Jones, M., Jones, T.A., Joy, A., Kamal, M., Karlsson, E.K., et al. (2002). *Nature*, **420**, 520-62.
- Wilke, C.M., Hall, B.K., Hoge, A., Paradee, W., Smith, D.I. & Glover, T.W. (1996). *Hum Mol Genet*, **5**, 187-95.
- Yu, Y., Okayasu, R., Weil, M.M., Silver, A., McCarthy, M., Zabriskie, R., Long, S., Cox, R. & Ullrich, R.L. (2001). *Cancer Res*, **61**, 1820-4.
- Yunis, J.J. & Soreng, A.L. (1984). *Science*, **226**, 1199-204.
- Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W.G. (1998). *Cell*, **92**, 725-34.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. & Roussel, M.F. (1998). *Genes Dev*, **12**, 2424-33.
- Zlotorynski, E., Rahat, A., Skaug, J., Ben-Porat, N., Ozeri, E., Hershberg, R., Levi, A., Scherer, S.W., Margalit, H. & Kerem, B. (2003). *Mol Cell Biol*, **23**, 7143-51.

Publikationen

Niedermaier M, Schwabe GC, Fees S, Helmrich A, Brieske N, Seemann P, Hecht J, Seitz V, Stricker S, Leschik G, Schröck E, Selby PB, Mundlos S. An Inversion Involving the Mouse Shh Locus Results in Brachydactyly through Dysregulation of Shh Expression. *Journal of Clinical Investigation*. (im Druck)

Helmrich A, Lee S, O'Brien P, Dörken B, Lowe SW, Schröck E, Schmitt CA. Recurrent chromosomal aberrations in *INK4a/ARF* defective primary lymphomas predict drug responses *in vivo*. *Oncogene*. (in Revision)

Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, Matthäi A, Heiden T, Schröck E. The coding region for the large IMMP2L gene expresses frequent Common Fragile Sites in human and in mouse. (Manuskript in Vorbereitung)

Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, Heiden T, Schröck E. Common Fragile Sites – conserved instability at large active genes. (Manuskript in Vorbereitung)

Posterbeiträge auf Tagungen und Kongressen

Helmrich A, Stout-Weider K, Heiden T, Schröck E. Identification of five new Common Fragile Sites that are conserved between human and mouse. Fragilome – Chromosomal instability, fragile sites and cancer, 17.-19. Februar 2005, Heidelberg

Hardt T, Heiden T, Helmrich A, Matthäi A, Pettersson M, Stout-Weider K, Schröck E. Identification of basic cellular mechanisms resulting in tumor-specific chromosomal translocations. BMBF BioFuture, Januar 2005, Berlin

Hardt T, Heiden T, Helmrich A, Matthäi A, Stout K, Trotier F, Schröck E. Identification of basic cellular mechanisms resulting in tumor-specific chromosomal translocations. BMBF BioFuture, März 2004, Berlin

Helmrich A, Stout K, Hermann K, Heiden T, Schröck E. Identification of five new Common Fragile Sites that are conserved between human and mouse. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 12.-15. Juni 2004, München

Helmrich A, Lee S, Dörken B, Lowe SW, Schröck E, Schmitt CA. Molecular cytogenetic analyses refine the impact of *INK4a/ARF* defects on chemoresistance. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 1.-4. Oktober 2003, Marburg

Hardt T, Heiden T, Helmrich A, Matthäi A, Stout K, Trotier F, Schröck E. Identification of basic cellular mechanisms resulting in tumor-specific chromosomal translocations. BMBF BioFuture, Januar 2003, Berlin

Helmrich A, Schmitt CA, Lowe SW, Schröck E. Cytogenetic comparison of ARF-null and INK4a/ARF-null lymphomas in the mouse. 93rd Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR), 6.-10. April 2002, San Francisco

Hardt T, Heiden T, Helmrich A, Matthäi A, Stout K, Trotier F, Schröck E. Identification of basic cellular mechanisms resulting in tumor-specific chromosomal translocations. BMBF BioFuture, Januar 2002, Berlin

Anhang

Anhang Analyse der Häufigkeiten evolutionärer Brüche und weiterer molekularer Eigenschaften in humanen und Maus-homologen CFSs sowie in stabilen Kontrollregionen. Die Anzahl von Synteniebrüchen (SB), Regionen erhöhter DNA-Helix-Flexibilität, große Gene und deren Expression in den Bereichen der humanen CFSs (schwarz) und ihrer Maus-Homologen (unterhalb, braun) sind gezeigt. Die CFS-Häufigkeiten in Lymphozyten entstammen Stout-Weider *et al.* (Mensch) und dieser Arbeit (Maus). Häufigkeiten für FRA7K und FRA7G, welche beide den Banden 7q31.1-q31.2 zugeordnet wurden, beruhen auf BAC-Hybridisierungsergebnissen dieser Arbeit. Die CFS-Kartierungsdaten der übrigen Gewebe wurden Murano *et al.*, 1989b (Fibroblasten), Simonic & Gericke, 1996 (Amniozyten) und Murano *et al.*, 1989a (Knochenmarkzellen) entnommen. *Aufgrund der schwierigen Unterscheidbarkeit der Banden 4q22-q24 entsprechen die CFS-Häufigkeiten für 4q22 den Kartierungsergebnissen für q22-q24. N.e., nicht als CFS erwähnt. O.A., ohne Angabe.

Die Häufigkeiten von SB und Regionen erhöhter DNA-Helix-Flexibilität sind in den CFSs gegenüber den Kontrollregionen nicht gesteigert. Große transkriptionell aktive Gene aber stellen ein spezifisches, konserviertes Merkmal häufig exprimierter CFSs dar.

Chromosomale Region (erster Marker/BAC- Klon – letzter Marker/BAC-Klon bzw. Gene)	Quelle der CFS- Lokalisierung und verwendeter Zelltyp	Größe (Mb)	Anzahl SB	Anzahl von Flexibilität sinseln / Mb	Anzahl von Flexibilitätskl ustern / Mb	Gene > 650kb (Mb)	Häufigkeit der CFS-Expression per Bande in % der Gesamtmenge der CFSs und Genexpressionswerte			
							humane T- Lymphozyten B- und T- Lymphozyten der Maus	Haut- fibroblasten	Amniozyten	Knochen- markzellen
G-Banden CFSs										
FRA4F (RP11- 466G12 – 145G20)	(Rozier <i>et al.</i> , 2004) T-Lymphozyten	8,02	≥ 1	39,7	1,9	<i>GRID2</i> (1,5)	0,8* 330	n.e.* 350	2,1* 230	12,3* 370
<i>Fra6C1</i> (RP23-474E7 – RP23- 10A23)	(Rozier <i>et al.</i> , 2004) T-Lymphozyten	11,19	≥ 1	45,1	2,5	<i>Grid2</i> (0,8)	0,4	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
FRA6E (RH92608 – RH63999)	(Denison <i>et al.</i> , 2003a) Lymphozyten	3,23	0	31,2	1,2	<i>PARK2</i> (1,4)	0,5 218	n.e. 281	2,3 240	n.e. 281
FRA7E (D7S1934 – SHGC- 104456)	(Zlotorynski <i>et al.</i> , 2003) Fibroblasten- Zellinie	4,53	0	59,6	3,6	-	0,7	n.e.	n.e.	n.e.
FRA7K (WI-5281– SHGC- 78648)	(diese Arbeit) T-Lymphozyten	0,45	0	33,2	0	<i>IMMP2L</i> (0,9)	2,0 513	3,5 275	2,0 450	13,7 350
<i>Fra12C1</i> (RP23-75F23 – RP23- 153D4)	(diese Studie) Lymphozyten	1,14	0	49,3	3,5	<i>Immp2l</i> (1,0)	5,4	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

FRA7I (SHGC-153624 – SWSS2627)	(Ciullo <i>et al.</i> , 2002) Fibrosarcoma- Zelllinie	1,48	0	56,7	3,3	<i>CNTNAP2</i> (2,3)	0,0 112	n.e. 96	n.e. 49	n.e. 108
FRA16D (RH54766 – SHGC- 140002)	(Krummel <i>et al.</i> , 2000) Lymphozyten	2,03	0	30,0	1,5	<i>WWOX</i> (1,1)	3,1 677	10,3 593	14,2 730	7,0 957
Fra8E1 (Wwox)	(Krummel <i>et al.</i> , 2002) T-Lymphozyten	0,92	0	48,8	4,3	<i>Wwox</i> (0,9)	1,8	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
R-Banden CFSs										
FRA2G (RH91148 – RH1293)	(Limongi <i>et al.</i> , 2003) Lymphozyten	0,97	0	22,6	0	-	0,3	n.e.	n.e.	n.e.
Fra2D (RP23-10N12 – RP23- 431M12)	(diese Studie) Lymphozyten	1,14	0	39,4	0,9	-	0,2	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
FRA3B (SHGC-84349 – RH16786); [FRA3B Epizentrum (RP11-70P20 – RP11- 154D3)]	(Becker <i>et al.</i> , 2002) Lymphozyten	4,27 [2,68]	0	24,1 [24,3]	0,5 [0,7]	<i>FHIT</i> (1,5); <i>PTPRG</i> (0,7) [<i>FHIT</i> (1,5); <i>PTPRG</i> (0,7)]	3,3 1000; 15	2,7 300; 60	13,3 240; 180	11,1 400; 60
Fra14A2 (Fhit – Ptprg)	(Glover <i>et al.</i> , 1998) Lungenepithel- Zelllinie und embryonale Fibroblasten- Zelllinien	2,73	0	38,5	1,1	<i>Fhit</i> (1,6); <i>Ptprg</i> (0,7)	1,1	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
FRA6F (SHGC-103019 – SHGC-82095)	(Morelli <i>et al.</i> , 2002) T-Lymphozyten	1,16	0	26,6	0	-	0,5	n.e.	n.e.	n.e.
FRA7G (D7S767 – RH40796)	(Hellman <i>et al.</i> , 2002) Lymphozyten- Zelllinien	4,39	1	41,9	1,8	-	0,1	Ergebnisse für 7q31 siehe FRA7K	Ergebnisse für 7q31 siehe FRA7K	Ergebnisse für 7q31 siehe FRA7K

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Chromosomale Region (erster Marker/BAC- Klon – letzter Marker/BAC-Klon bzw. Gene)	Quelle der CFS- Lokalisierung und verwendeter Zelltyp	Größe (Mb)	Anzahl SB	Anzahl von Flexibilität sinseIn / Mb	Anzahl von Flexibilitätskl ustern / Mb	Gene > 650kb (Mb)	Häufigkeit der CFS-Expression per Bande in % der Gesamtmenge der CFSs und Genexpressionswerte			
							humane T- Lymphozyten B- und T- Lymphozyten der Maus	Haut- fibroblasten	Amniozyten	Knochen- markzellen
Fra6A3.1 (RP23-117H11 – RP23-73G15)	(diese Studie) Lymphozyten	0,59	0	47,7	1,7	-	0,2	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
FRA7H (SWSS2777 – SHGC- 31402) [FRA7H Epizentrum (AC008264 - AC083872)]	(Mishmar <i>et al.</i> , 1998) Fibroblasten- Zelllinie	3,85 [2,65]	0	21,8 [21,1]	0,8 [1,1]	SEC8 (0,8) [SEC8 (0,8)]	2,4 645	0,5 400	1,0 470	n.e. 480
Fra6B1 (RP23-194E21 – RP23-255I14)	(diese Studie) Lymphozyten	2,58	0	32,6	0,4	Sec8 (0,7)	1,6	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
FRA9E (SHGC-78596 – RH62868) Fra4C2 (RP23-6A13 – RP23- 395A21)	(Callahan <i>et al.</i> , 2003) Lymphozyten (diese Studie) Lymphozyten	9,68 8,06	0 0	29,7 42,8	0,8 1,7	- Astrn2 (1,0)	0,7 0,5	n.e. nicht untersucht	n.e. nicht untersucht	n.e. nicht untersucht
FRAXB (RH68074 – DXS1133)	(Arlt <i>et al.</i> , 2002) T-Lymphozyten	0,50	o.A.	50,3	2,0	-	3,1	1,4	n.e.	n.e.
humane Kontrollregionen		(G- oder R-Bande)								
7q31.1 (SHGC-80779 – SHGC-112009)		2,96	o.A.	45,5 (G)	2,7 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
1q42		13,10	3	21,0 (G) 21,4 (R)	0,3 (G) 0,8 (R)	-	0,0	n.e.	n.e.	n.e.
4q13		16,90	0	48,0 (G) 44,4 (R)	2,1 (G) 2,4 (R)	LPHN3 (0,9)	0,1 85	n.e. 215	n.e. 220	n.e. 165

4q32	14,70	≥ 1	45,0 (G) 64,6 (R)	2,0 (G) 3,9 (R)	<i>FSTL5</i> (0,8)	0,0 93	n.e. 57	n.e. 38	n.e. 107
6q22	15,60	≥ 1	39,2 (G) 30,8 (R)	1,4 (G) 0,0 (R)	<i>TCBA1</i> (1,0)	0,0 250	n.e. 300	n.e. 250	1,3 200
7q31.3	9,70	0	47,1 (G) 46,3 (R)	2,1 (G) 3,0 (R)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
8q21	19,20	2	40,8 (G) 45,4 (R)	1,6 (G) 2,8 (R)	<i>LOC138046</i> (0,7)	0,1 50	n.e. 50	n.e. 50	n.e. 230
10q23	14,10	1	33,1 (G) 25,1 (R)	0,8 (G) 1,1 (R)	-	0,0	n.e.	n.e.	n.e.
13q12	12,70	1	23,9 (R)	0,4 (R)	-	0,0	n.e.	n.e.	n.e.
13q31	15,90	0	54,6 (G) 93,5 (R)	2,9 (G) 7,8 (R)	<i>GPC5</i> (1,5); <i>GPC6</i> (1,2)	0,1 80; 113	n.e. 30; 110	n.e. 110; 70	n.e. 35; 45
15q24-q25	16,40	≥ 4	21,3 (G) 20,8 (R)	0,6 (G) 0,1 (R)	-	0,0	n.e.	n.e.	n.e.
Maus-Kontrollregionen									
1C1.1 (C78142-D1MIT528)	6,10	0	51,0 (G)	2,0 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
2C3 (AU015584-D2MIT524)	9,07	0	53,6 (G)	2,5 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
2E1 (D2MIT248-PTPRJ)	10,00	2	52,6 (G)	2,7 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
3H2 (D3MIT351-D3MIT84)	4,32	1	57,4 (R)	3,5 (R)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
4A3 (D4MIT317-D4MIT260)	10,00	1	44,4 (G)	2,0 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
5A3 (D5MIT178-D5MIT250)	9,00	0	51,7 (G)	2,7 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
8A3 (CHRNA6-WRN)	5,88	0	59,0 (R)	3,2 (R)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
14D3 (D14MIT37-AI646531)	11,55	1	36,4 (R)	1,4 (R)	-	0,1	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
15D1 (D15MIT152-HSH)	12,97	0	50,7 (G)	3,9 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht
15D3 (D15MIT50-D15MIT105)	12,91	0	41,1 (G)	1,1 (G)	-	0,0	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Bedanken möchte ich mich bei...

...Frau Prof. Dr. Evelin Schröck für die Betreuung der Arbeit. Ihre freundliche und respektvolle Art hat mit dazu beigetragen, daß ich mich in der Arbeitsgruppe stets wohlfühlt habe. Darüberhinaus ließ sie mir große Freiheit bei der Bearbeitung des Themas und sie gab mir die Möglichkeit, an verschiedenen Kongressen teilnehmen zu können. Danke für das Vertrauen in mich!

...Herrn Dr. Thomas Heiden, dem zweiten Betreuer meiner Arbeit. Seine zahlreichen Anregungen bei der Auswertung der Daten waren mir eine große Hilfe.

...Herrn Prof. Dr. Gerhard Rödel für die Bereitschaft, die fakultätsinterne Betreuung und Vertretung dieser Arbeit zu übernehmen.

...allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tumorgenetik für die stete Hilfsbereitschaft und so manch kritische Diskussion. In einem fragilen Feld halfen sie mir, den festen Boden unter meinen Füßen zu behalten.

...Herrn Dr. Clemens A. Schmitt für eine erfolgreiche Kooperation.

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Molekulare Biotechnologie Jena, am Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin und am Institut für Klinische Genetik der TU Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Frau Prof. Dr. Evelin Schröck angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 01. Februar 2005

Anne Helmrich